

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi

Diplomová práce

Bc. Tereza Furiková

Výživa a potraviny

Vedoucí práce prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Roman Švejtil, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, díky kterým jsem mohla tuto práci uskutečnit. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Romanu Švejstilovi, Ph.D. za ochotu a trpělivost při konzultacích. V neposlední řadě děkuji rodině, která mě při studiu podporuje.

Kolonizace trávicího traktu bifidobakteriemi

Souhrn

Tato diplomová práce pojednává o faktorech ovlivňující kolonizaci trávicího traktu mláďat savců. Gastrointestinální trakt je osídlen velkým množstvím bakterií vyskytujících se převážně v tlustém střevě. Toto bakteriální osídlení se nazývá mikrobiota. Složení mikrobioty je pro každého jedince specifické a rozvíjí se bezprostředně po narození. Bifidobakterie tvoří dominantní část mikrobioty kojenců a patří tak mezi důležité kolonizátory, které pozitivně ovlivňují zdraví jedince. Způsob porodu a druh výživy jsou zásadními faktory ovlivňující počáteční kolonizaci. Oligosacharidy mateřského mléka podporují růst prospěšných bifidobakterií. Vnější faktory jako stravovací návyky, probiotika, užívání léků, zejména antibiotik, ale i přibývajícím věkem ovlivňují množství bifidobakterií v těle matky, ale i u jiných dospělých jedinců. Nejen bifidobakterie, ale správné mikrobiální osídlení podporuje funkci imunitního systému a plní řadu důležitých funkcí, jako je například syntéza vitaminů, ochranná bariéra proti patogenům a tvorba mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Vzhledem k jejich pozitivnímu působení je snaha o jejich perzistenci.

Cílem diplomové práce bylo ověřit, zda může být mléko matky zdrojem bifidobakterií pro kolonizaci trávicího traktu potomka. Na základě testování probiotických vlastností byl pro tento experiment vybrán vhodný kmen *Bifidobacterium animalis* spp. *Animalis*, který byl zkoumán u krav. Tyto bifidobakterie byly rifampicin rezistentní mutanti, kteří jsou snadno rozeznatelní při kultivační analýze. Díky nim lze sledovat vše, co bylo touto bakterií kolonizováno. Krávy byly rozděleny na dvě skupiny. Oběma skupinám matek bylo podáváno kysané mléko s kmenem rifampicin rezistentních bifidobakterií po dobu 4 dnů před otelením. První skupině krav bylo tele okamžitě po porodu odebráno a nakrmeno mlezivem jiné krávy, kterým nebyly bifidobakterie podávány. Druhé skupině krav byla telata ponechána po dobu 24 hodin a bylo jim umožněno sát mlezivo přímo od matky. Od matek byly následně odebrány vzorky z tlamy, vagíny, výkalů a mateřského mléka, u telat byly vzorky odebrány pouze z tlamy a výkalů. Kultivační metodou byly dále stanoveny celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterií, laktobacilů, *Escherichia coli*, koliformních bakterií a rifampicin rezistentních bifidobakterií.

Zjištění diplomové práce bylo, že bifidobakterie podávané krávám před otelením se ve větší míře nedostaly do mléka matek. Tudíž mléko nemohlo být významným zdrojem bifidobakterií a neovlivnilo tak mikrobiotu telete. Pravděpodobněji byl zdrojem bifidobakterií u telat trávicí trakt matky než její mléko.

Klíčová slova: Bifidobakterie; trávicí trakt; mléko; kolonizace; střevní mikrobiota.

Colonization of gastrointestinal tract by bifidobacteria

Summary

This diploma thesis deals with factors influencing the colonization of the digestive tract of mammalian calves. The gastrointestinal tract is populated by a large number of bacteria occurring mainly in the large intestine. This bacterial colonization is called microbiota. The composition of the microbiota is specific to individuals and develops immediately after birth. Bifidobacteria form the dominant part of the microbiota of infants and are thus among the important colonizers that positively affect the health of the individual. The method of delivery and the type of nutrition are fundamental factors influencing the initial colonization. Breast milk oligosaccharides support the growth of beneficial bifidobacteria. External factors such as eating habits, probiotics, the use of drugs, especially antibiotics, but also increasing age affect the amount of bifidobacteria in the body of the mother, but also other adults. Not only bifidobacteria, but proper microbial colonization support the function of the immune system and perform many important functions, such as vitamin synthesis, protective barrier against pathogens, and the formation of short-chain fatty acids (SCFA). Due to their positive effect, there is an effort for their persistence.

The diploma thesis aimed to verify whether the mother's milk can be a source of bifidobacteria for colonization of the digestive tract of the offspring. Based on testing of probiotic properties, a suitable strain of *Bifidobacterium animalis* spp. *animalis* was selected for this experiment, which has been studied on cows. These bifidobacteria were rifampicin resistant mutants that are readily recognizable in the culture assay and can be easily monitored. The cows were divided into two groups. Both groups of mothers were given sour milk with a strain of rifampicin resistant bifidobacteria for 4 days before calving. In the first group of cows, the calf was removed immediately after birth and fed the colostrum of another cow to which no bifidobacteria had been administered. The second group of cows was left with calves for 24 hours and allowed to suck colostrum directly from the mother. Samples were then taken from the mother's mouth, vagina, feces, and breast milk, in calves samples were taken only from the mouth and feces. The total numbers of anaerobic bacteria, bifidobacteria, lactobacilli, *Escherichia coli*, coliform bacteria and rifampicin resistant bifidobacteria were further determined by the culture method.

The finding of the diploma thesis was that bifidobacteria administered to cows before calving did not get into the milk of mothers to a greater extent. Therefore, milk could not be a significant source of bifidobacteria and thus did not affect the calf microbiota. The mother's digestive tract was more likely to be the source of bifidobacteria in calves than her milk.

Keywords: Bifidobacteria; digestive tract; milk; colonization; intestinal microbiota.

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 Střevní mikrobiota savců.....	9
3.2 Faktory ovlivňující složení mikrobioty trávicího traktu.....	11
3.2.1 Formování střevní mikrobioty – Kolonizace trávicího traktu	11
3.2.2 Druh výživy	13
3.2.3 Věk.....	14
3.2.4 Vliv stravy na mikrobiotu.....	14
3.2.5 Probiotika.....	18
3.2.6 Antibiotika	20
3.2.7 Teorie enterotypů.....	21
3.3 Bifidobakterie	22
3.3.1 Charakteristika rodu.....	23
3.3.2 Vliv bifidobakterií na zdraví a nemoci	23
3.3.3 Identifikace Bifidobakterií.....	24
4 Metodika	25
4.1 Průběh experimentu	25
4.2 Mikrobiologická část.....	27
4.2.1 Příprava kultivačních médií a kultivace	27
4.3 Vyhodnocení	29
5 Výsledky.....	30
5.1 Porovnání matek	30
5.2 Porovnání telat	32
6 Diskuze	34
7 Závěr	38
8 Literatura.....	39
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	50
10 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Střevní mikrobiota je bakteriální osídlení trávicího traktu. Souvislosti mezi střevní mikrobiotou a zdravím hostitele se věnuje mnoho různých studií a bylo prokázáno, že vyvážená střevní mikrobiota má pozitivní účinky na funkci imunitního systému. Tyto bakterie plní řadu důležitých funkcí, jako například: tvorba vitaminů, SCFA, ochranou bariéru proti patogenům a udržují imunitní systém v rovnováze. Bakteriální složení je ovlivněno řadou různých faktorů příznivě či nepříznivě. Předpokládá se, že primární kolonizace je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících zdraví jedince v průběhu jeho života. Způsob porodu a druh výživy jsou nejpodstatnější a determinují správné formování mikrobioty. Mezi prvními bakteriemi, které kolonizují gastrointestinální systém, zdravého jedince, patří bifidobakterie a tvoří dominantní část mikrobioty kojenců. Plní řadu důležitých funkcí a brání kolonizaci patogenních bakterií.

V průběhu života dochází k poklesu množství bifidobakterií v těle a začínají převládat jiné druhy. Vnější faktory jako stravovací návyky, užívání léků, zejména antibiotik, ale i stárnutí ovlivňují jejich množství v těle. Proto jsou bifidobakterie součástí probiotik a jsou vedeny neustálé snahy o jejich udržení v gastrointestinálním traktu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Mléko matky je zdrojem bifidobakterií pro mládě. Uvádí se, že ke kolonizaci trávicího traktu bifidobakteriemi nedochází pouze prostřednictvím porodních cest a střevní mikrobioty, ale také mlékem matky.

Cílem diplomové práce bude ověřit, zda může být mléko matky zdrojem bifidobakterií pro kolonizaci trávicího traktu.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota savců

Pojem střevní mikrobiota se používá pro mikroorganismy obývající trávicí trakt živočichů. Mikrobi převážně osidlují sliznici tenkého, a především tlustého střeva. Jedná se o složitá mikrobiální uskupení, které jsou unikátní pro každého jedince (Rajilić-Stojanović et al. 2013). Na mikrobiotu se dá pohlížet jako na samostatný orgán, jelikož má i značný vliv na fyziologickou regulaci. Mikrobiota představuje ekosystém, který má významný vliv na fyzické i duševní zdraví daného jedince. Přispívá k formování imunitního systému a poskytuje přímou bariéru proti patogenům (Doré & Corthier 2010). Ve studii Degruittola et. all (2016) dokázali, že nevhodné mikrobiální osídlení, může hrát zásadní roli ve vzniku civilizačních chorob. Mezi tyto choroby patří alergie, zánětlivá onemocnění střev, případné metabolické a degenerativní poruchy. Bohužel, výskyt těchto nemocí se v současné době zvyšuje (Doré & Corthier 2010).

V dnešní době se pohlíží na střevní komenzální mikrobiotu jako na složitou populaci mikroorganismů, které udržují symbiotický vztah s hostitelem. Tato interakce přináší hostiteli výhody, mezi které patří adaptivní tvorba imunitního systému a udržování jeho homeostázy. Komenzální mikrobiota, stimulující reakce různých částí imunitního systému může tímto ovlivnit zdravotní stav hostitele. Vztah hostitel – mikrobiota se vyvinul tak, že je přínosným pro obě strany a jakékoliv jeho změny mohou vést k onemocnění (Fung et al. 2012; Cox et al. 2014). Dříve se pohlíželo na mikroby velmi omezeně, braly se v potaz pouze patogenní vlivy, které způsobují infekční nemoci. Ačkoliv Ilja Mečnikov (Metchnikoff & Mitchell 1910) před více než 100 lety teoretizoval nad kladným přínosem bakterií, získaných konzumací mléčných kysaných produktů. Tyto bakterie mají příznivý vliv na zdraví a přispívají dlouhověkosti. K intenzivnějšímu rozmachu využití bakterií pro obohacení trávicího traktu došlo teprve v polovině 90. let 20. století (Mackowiak 2013).

Mikrobiota dynamicky interaguje s hostitelským prostředím, jedná se o stále se měnící ekosystém (Costello et al. 2012). Prvotní formování mikrobioty probíhá při porodu, kdy jedinec je poprvé vystaven mikroorganismům. Způsob porodu je tedy zásadní pro primární kolonizaci trávicího traktu. Druh výživy a obecně strava je důležitým faktorem pro utváření stabilní střevní mikrobioty. Existují i další faktory, které mají značný vliv na mikrobiotu, mezi ně patří např.: užívání léků, zdravotní stav, stres a jiné. Tyto vnější i vnitřní faktory mění mikrobiotu v průběhu času (Uhr et al. 2019). Pochopením vlivu faktorů nám pomůže mikrobiomem manipulovat za účelem zkvalitnit zdraví jedince. Zjištěním za jakých podmínek a jakým způsobem určité faktory narušují přirozený vývin mikrobioty můžeme předejít určitým nemocem (Mueller et al. 2015).

Výskyt některých rodů je spojován se zdravím nebo nemocí. Například kolonizace střevního traktu bakteriemi rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* má bariérový účinek a chrání hostitele před patogeny (Mittal & Garg 1995; Garcia-Lafuente et al. 2001). Naproti tomu druhy *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* a *Streptococcus viridans* zvyšují střevní propustnost. Zvýšení propustnosti může vést k nevhodným imunitním reakcím, které vedou

k onemocnění (Irvine & Marshall 2000). Tím pádem ovlivnění výskytu těchto rodů vede ke zhoršení nebo zlepšení zdravotního stavu (LEE 2013).

Střevní mikrobiom je soubor genů (genom) mikrobioty, jedná se tedy o veškeré geny mikroorganismů žijících ve střevech jedince (Turnbaugh et al. 2007). Baquero & Nombela (2012) tvrdí, že počet genů, který obsahuje náš mikrobiom převyšuje více než stonásobně počet lidských genů.

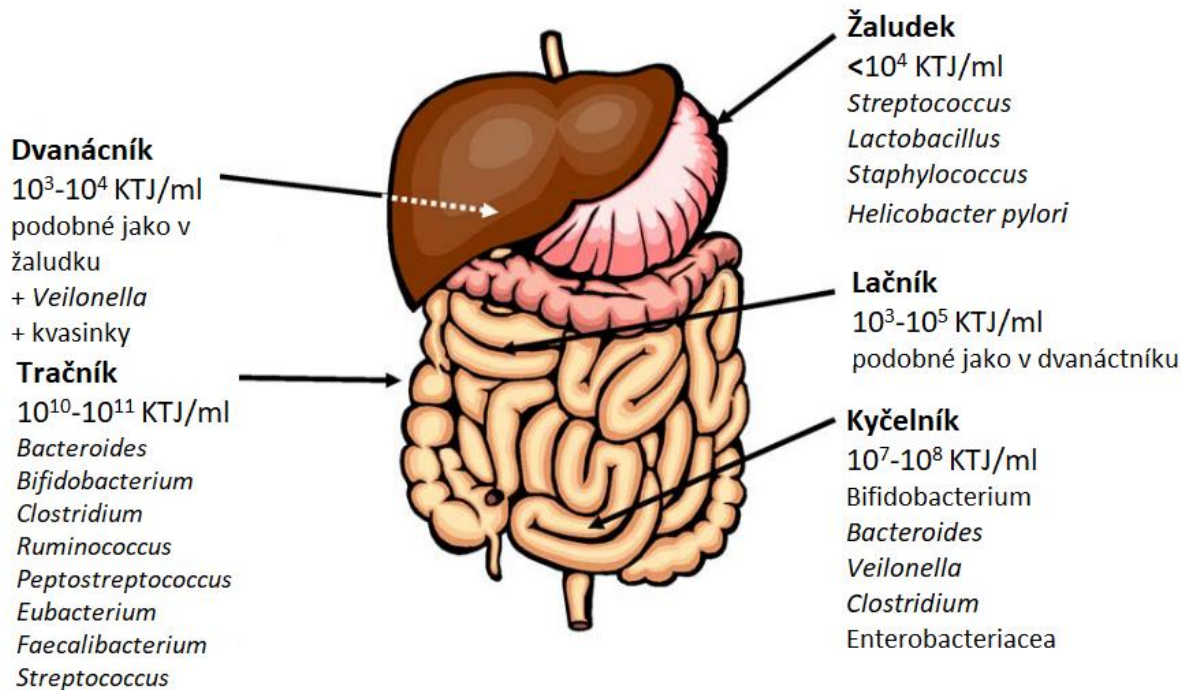
Lidská střevní mikrobiota

Lidský gastrointestinální trakt (GIT) obsahuje obrovskou škálu aerobních a anaerobních bakterií, které interagují ve složitém ekosystému (Monreal 2005). Identifikace jednotlivých bakteriálních populací vyžaduje komplexní analýzy. Ukázalo se, že každá část gastrointestinálního traktu obsahuje jedinečné bakteriální osídlení (Hillman et al. 2017). Přehled bakteriálních zastoupení v různých částech gastrointestinálního traktu viz obrázek 1. Následující kapitola se bude zaměřovat převážně na střevní mikrobiotu.

Většina orálních bakterií putujících do žaludku bývá zničena žaludečními kyselinami. Nízké pH a rychlý průchod tráveniny nejsou příznivé pro rozvoj mikroorganismů, proto bývají bakteriální koncentrace v žaludku menší než 10^4 kolonií tvořících jednotek (KTJ) v 1 ml. Mikrobiota žaludku je grampozitivní a aerobní. Nejčastěji izolované jsou zde streptokoky, stafylokoky a laktobacily (Tiihonen et al. 2010).

Tenké střevo tvoří přechodovou zónu mezi řídké osídleným žaludkem a hojně osídleným tlustým střevem. Bakteriální koncentrace ve dvanáctníku je 10^3 až 10^4 KTJ/ml a převládají zde streptokoky, stafylokoky a laktobacily. Rody *Veillonella* a *Actinomyces* jsou také často izolované, zatímco koliformní bakterie a jiné anaerobní bakterie se nacházejí v nižších koncentracích. V distálním ileu začínají gramnegativní bakterie převyšovat počet grampozitivních organismů. Koliformní bakterie jsou trvale přítomny a anaerobní bakterie rodů *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* a *Clostridium* se vyskytují v podstatných koncentracích (Tiihonen et al. 2010). Zvyšující se počty striktně anaerobních bakterií jsou dány snižujícím se redoxním potenciálem. Tento redoxní potenciál snižují aerobní a fakultativně anaerobní bakterie tím, že spotřebovávají kyslík. Distálně od ileocekálního svěrače se bakteriální koncentrace prudce zvyšují.

V tlustém střevě je bakteriální koncentrace 10^{11} až 10^{12} KTJ/ml. Anaerobní bakterie převyšují počet aerobních bakterií. Nejpočetnější jsou kmeney Firmicutes, Proteobacteria Actinobacteria. Převládajícími rody jsou *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a *Eubacterium*. Vyskytují se zde také anaerobní grampozitivní koky, klostridie, enterokoky a různé rody čeledi Enterobacteriaceae (Tiihonen et al. 2010).



Obrázek 1: Bakteriální zastoupení intestinální mikrobioty v různých částech gastrointestinálního traktu (Tiihonen et al. 2010).

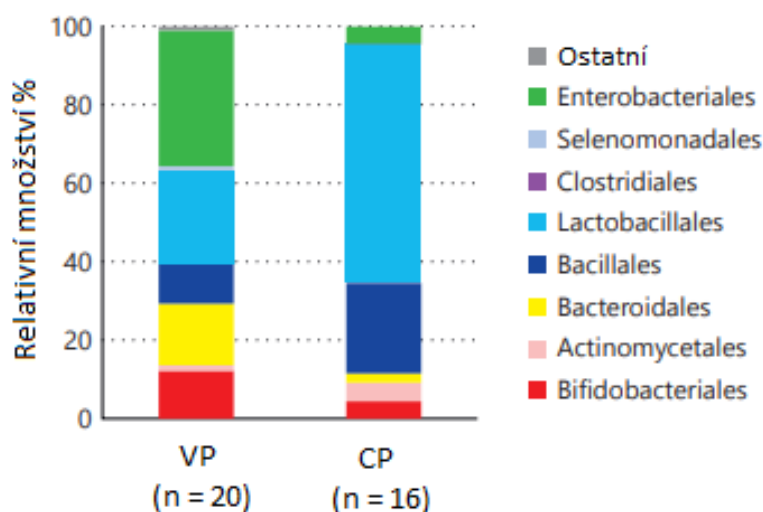
3.2 Faktory ovlivňující složení mikrobioty trávicího traktu

Složení střevní mikrobioty je ovlivněno nejen počáteční kolonizací trávicího traktu, ale také dalšími faktory jako jsou věk, vliv stravy v pozdějším věku, antibiotika a je zde zmíněna i teorie enterotypů. Tyto jednotlivé vlivy jsou popsány v podkapitolách níže.

3.2.1 Formování střevní mikrobioty – Kolonizace trávicího traktu

Kolonizace střeva začíná narozením a pokračuje během rané fáze života za vzniku střevní mikrobioty, která je u každého jednotlivce odlišná (Salminen & Isolauri, 2006). Předpokládá se, že během standardního těhotenství je prostředí dělohy matky bez přítomnosti bakterií. Tento předpoklad však vyvracejí studie, které se zabývají přítomností mikrobů v plodové vodě (Oh et al. 2010), pupečnickové krvi (Jiménez et al. 2005), plodové membráně (Steel et al. 2005) a placentě (Stout et al. 2013) u zdravých těhotných žen, které porodily vaginální cestou nebo císařským řezem. Předmětem pro diskusi tedy zůstává otázka, jestli je plod opravdu sterilní a je potřeba toto tvrzení podrobněji prozkoumat. Je nutná opatrnost při interpretaci výsledků těchto studií, protože riziko kontaminace sterilních vzorků bez bakterií je velmi vysoké. Jelikož tyto studie využívají pro sekvenování vzorků s nízkou mikrobiální biomasou (jako jsou právě vzorky placenty a jiného nitroděložního prostředí) vysoce výkonné analyzátoary (Mueller et al. 2015).

K masivní bakteriální kolonizaci novorozence dochází při porodu. Způsob porodu je považován za důležitý faktor ovlivňující složení střevní mikrobioty (Musilova et al. 2015). Vaginálně narození jedinci přicházejí do styku s vaginální, fekální a kožní mikrobiotou matky. Během vaginálního porodu dominují kolonizaci bakterie řádu Enterobacteriales, Lactobacillales, ale také Bifidobacteriales, lze vidět na obrázku 2. Konkrétně převažují rody jako *Lactobacillus* a *Prevotella*. Právě fakultativně anaerobní rod *Lactobacillus* spotřebovává zbytky kyslíku, který se vyskytuje ve střevech novorozence a připraví tak vnitřní prostředí pro osídlení dalšími bakteriálními druhy. Navíc vytváří kyselé prostředí a zabraňuje osídlení patogeny (Dominguez-Bello et al. 2010; Biasucci et al. 2010).



Obrázek 2: Procentuální zastoupení bakterií u dětí narozených vaginálním porodem a dětí narozených císařským porodem (Akagawa et al. 2019).

Naproti tomu u císařského řezu nejsou jedinci přímo vystaveni mateřským mikrobům. Tímto narozením je novorozenec ochuzen o přirozenou kolonizaci sliznic z poševní flóry matky. Je pravděpodobnější, že budou kolonizovány mikroorganismy z prostředí, a to hlavně z kůže matky, nemocničního prostředí a personálu (Bokulich et al. 2016). Proteobakterie a bakterie kmene Firmicutes byly uváděny jako hlavní kmene zastoupené během prvních dnů života. Z grafu na obrázku výše je zřetelné, že majoritním řádem bakterií jsou Lactobacillales. Přičemž aktinobakterie se objevovaly ve výkalech dětí narozených císařským řezem v 7 až 15 dnu po narození (Del Chierico et al. 2015). Jedinci narození císařským řezem také vykazují nižší bakteriální diverzitu střevní mikrobioty a rody *Bifidobacterium* a *Bacteroides* se u nich vyskytují v nižších počtech. Zatímco jsou ve větším množství kolonizovány některými bakteriemi *Clostridium*, například *Clostridium difficile* (Penders et al. 2006; Jakobsson et al. 2014). Ve studii Shao et al. (2019) bylo zaznamenáno vyšší zastoupení některých patogenních bakterií. Konkrétně se jednalo o druhy *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* a *Clostridium perfringens*. Do styku s těmito bakteriemi přišli

novorozenci v nemocničním prostředí, jelikož děti narozené císařským řezem tráví často více času po porodu v nemocnici.

Vývoj střevního mikrobiomu novorozence se stává různorodějším a druhově bohatším s tím, jak dítě přichází do styku s bakteriemi z různých zdrojů. Podle studie (Stewart et al. 2018) se střevní mikrobiom ustaluje zhruba ve věku 3 let. V této stabilní fázi tvoří mikrobiom především zástupci kmene Firmicutes.

Oba způsoby porodů nesou své výhody i nevýhody. Bezpečnost matky a dítěte je však při porodu prioritou. Přestože je obvykle vaginální porod upřednostňovaný, pokud je vaginální porod ze zdravotních důvodů nepřiměřeně rizikový, tak je nutné přistoupit k císařskému řezu (Chen & Tan 2019).

3.2.2 Druh výživy

Druh výživy je dalším významným faktorem určujícím, jaké mikroorganismy budou četnější a jaké méně. Stále jsou zkoumány rozdíly ve střevním mikrobiálním složení u kojenců plně kojených a kojenců na umělé výživě (O'Sullivan et al. 2015).

U dětí krmených mateřským mlékem bylo prokázáno, že mají stabilnější a rovnoměrnější procentuální zastoupení jednotlivých druhů bakterií v trávicím traktu (TT) ve srovnání s jedinci krmenými kojeneckou výživou (Bezirtzoglou et al. 2011). Mateřské mléko je zdrojem látek, nezbytných pro správný vývoj novorozenců. Obsahuje proteiny, lipidy, sacharidy (laktóza, galaktóza a oligosacharidy) a také důležité protilátky. Sacharidy mateřského mléka podporují růst prospěšných mikrobů konkrétně bifidobakterií. Mateřské mléko podporuje přirozený vývoj střevní mikrobioty a imunitního systému jedince. Děti kojené mateřským mlékem měly ve svém střevní mikrobiotě vyšší zastoupení probiotických bifidobakterií a laktobacilů. Identifikované druhy byly především *Lactobacillus johnsonii*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. rhamnosus* a *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* (Harder et al., 2005; Adlerberth & Wold 2009; Bäckhed et al., 2015). Prokázaný druh bakterie byl i *Staphylococcus epidermis*, který se do gastrointestinálního traktu (GIT) dětí dostal při sání mléka z matčiny pokožky (Lee et al. 2015).

Existují studie, které tvrdí, že střevní mikrobiota kojených jedinců vykazuje nižší rozmanitost než u jedinců krmených kojeneckou výživou (Bezirtzoglou et al. 2011).

U kojenců na umělé výživě se rozvíjejí jiné druhy střevních bakterií. U těchto kojenců lze nalézt odlišné mikrobiální vzorce ve střevě než u kojenců plně kojených. Větší rozmanitost způsobuje, že jedinci na umělé výživě dosahují podobnosti mikrobioty dospělých mnohem dříve (Bäckhed et al. 2015). Bifidobakterie jsou nejvíce zastoupeným rodem u kojenců plně kojených i kojenců na umělé výživě (Fanaro et al., 2003; Fallani et al., 2010; Bezirtzoglou et al., 2011). Mezi bifidobakterie, které jsou shodné u kojenců i jedinců na umělé výživě jsou *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis*, *B. longum* ssp. *longum* a *B. bifidum*. Typickým zástupcem u kojenců je *B. longum* ssp. *infantis*, zatímco *Bacteroides fragilis* je typický pro jedince živené umělou výživou (Mackie et al., 1999; Penders et al., 2006). Enterobakterie a rod *Bacteroides* představují dvě nejčastěji nalezené bakterie po bifidobakteriích u obou druhů výživy (Harmsen et al., 2000; Fanaro et al., 2003; Fallani et al., 2010). Jedinci živení umělou výživou mají rozmanitější střevní mikrobiotu, ve které se více objevují stafylokoky, *Bacteroides* spp., klostridie (*C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. clostridiiforme*, *C. difficile*,

and *C. tertium*), enterokoky (*E. faecalis*), enterobakterie a rod *Atopobium* (Penders et al., 2006; Martin et al., 2016).

3.2.3 Věk

Zatímco mikrobiom zůstává relativně stabilní po celý dospělý život, existují dvě období života, při kterých je mikrobiota méně stabilní – časný život a stáří. V prvních letech života existují různé faktory, které ovlivňují vývoj mikrobioty a byly popsány výše. Přibližně po třetím roce života zůstává relativní podíl zastoupených mikrobiálních taxonů většinou stabilní, ale složení mikrobioty lze v průběhu času měnit zejména stravou, ale i užíváním různých léků (Faith et al. 2013). U starších osob bylo zjištěno, že složení mikrobioty má odlišné bakteriální druhy ve srovnání s průměrným mikrobiomem zdravých dospělých (Odamaki et al. 2016). Samotné stárnutí má relativně malý vliv na celkovou střevní funkci. Rozdíl v mikrobiotě bývá spojován s procesy souvisejícími s věkem jako je snížená pohyblivost, hospitalizace a užívání léků (Zapata & Quagliarello 2015). Jedním z nejčastějších problémů u starších jedinců je nevyvážená strava. V důsledku sníženého žvýkání a chuťových vjemů, zejména čichu, starší lidé konzumují obvykle nižší množství vlákniny (Laurin et al. 1994) nebo neškrobových sacharidů, které snižují mikrobiální fermentaci v tlustém střevě. Naproti tomu zvýšený mikrobiální růst v tenkém střevě způsobený sníženou sekrecí kyselin v žaludku může vést k malabsorpci živin a vitamínů (Elphick et al. 2006).

Studie zabývající se mikrobiotou u stárnoucích jedinců došly ke sporným výsledkům. Ve studiích Hopkins et al. (2001) a Claesson et al. (2011) byl u starších pacientů zaznamenán pokles bifidobakterií a laktobacilů se zvýšením počtu *Bacteroides* spp. a fakultativních anaerobů. Naproti tomu v jiné studii uváděli vyšší hladiny *Ruminococcus* a nižší hladiny eubakterií a *Bacteroides* spp. (He et al. 2003) s vyššími hladinami bifidobakterií ve srovnání s mladšími protějšky (Harmsen et al. 2000). A žádné rozdíly nebyly zaznamenány mezi staršími a mladšími jedinci, s výjimkou vyššího počtu aerobů u starších osob ve studii Tiihonen et al. (2010).

Další studie se také zabývaly rozdíly v mikrobiotě u starších jedinců v závislosti na zemi, ve které žijí. U malé populace starších italských jedinců bylo pozorováno zvýšení rodu *Faecalibacterium* a hladina rodu *Bacteroidetes* se nezměnila (Biagi et al. 2010). Naopak ve velké skupině irských seniorů rody *Bacteroidetes* a *Faecalibacterium* výrazně vzrostly (Claesson et al. 2011). Ve výše zmíněné skupině Italů nebyly zjištěny žádné rozdíly v mikrobiotě při srovnání mladých dospělých (30 let) a starších (70 let). Naopak ve stejné skupině stoletých jedinců výsledky vykazovaly odlišné složení jejich mikrobioty. Zatímco kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* byly stále přítomny v množstvích srovnatelných s hladinami mladších dospělých, byl patrný pokles rodu *Clostridium* a nárůst bacilů (Biagi et al. 2010). Navíc nárůst Proteobakterií, takzvaných „pathobiontů“, pozorovaný u seniorů může vysvětlovat vysokou frekvenci infekcí (Pédron & Sansonetti 2008).

3.2.4 Vliv stravy na mikrobiotu

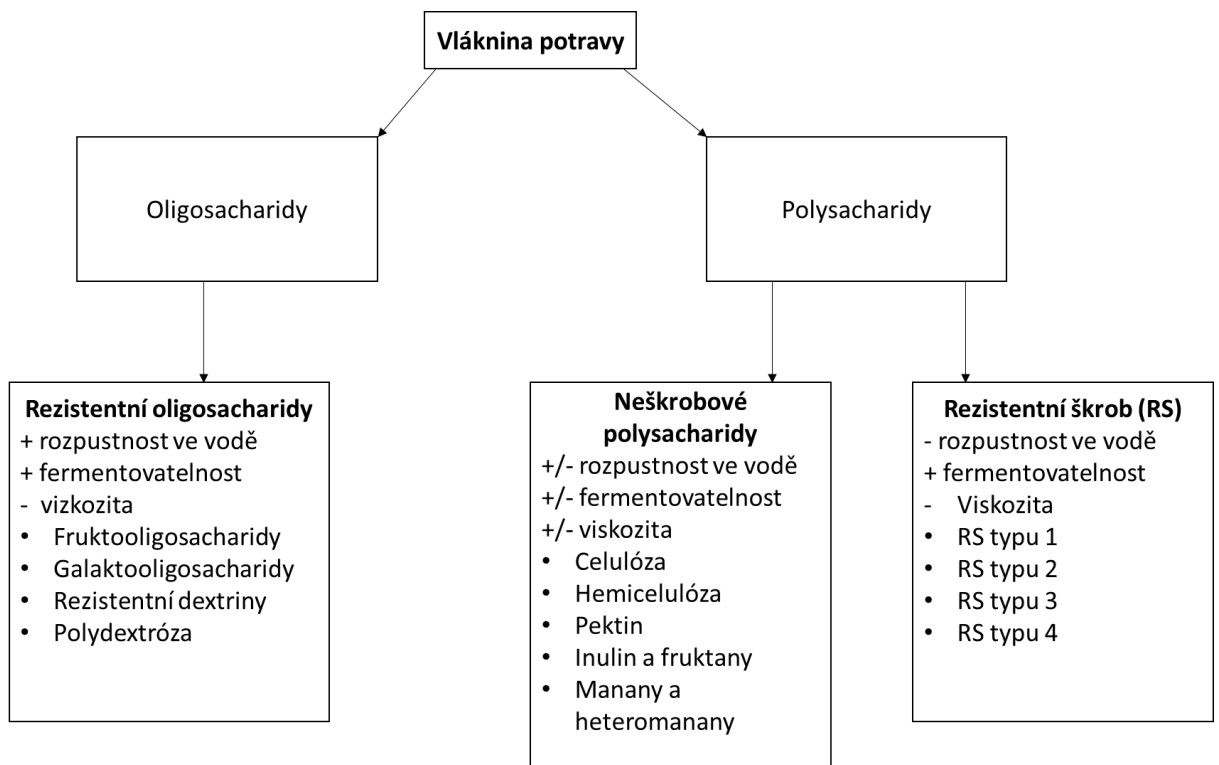
Významná změna nastává při přechodu z kojení na konzumaci pevné stravy. Stravování je faktor, který nepochybně ovlivňuje složení střevní mikrobioty. Stravování poskytuje živiny

jak pro hostitele, tak i pro bakterie GIT. Bakterie mají různé genetické vybavení pro využití různých substrátů (Scott et al. 2008). Některé bakterie využívají sacharidy jako primární zdroj energie. Pokud sacharidy v prostředí nejsou, tak bakterie nerostou (Apajalahti 2005). Doplnění stravy prebiotiky, jako je inulin a fruktooligosacharidy mohou podporovat růst specifických skupin bakterií, včetně bifidobakterií (Gibson 1999).

Nestravitelné sacharidy (oligosacharidy mateřského mléka, inulin a fruktooligosacharidy), nerozpustné komplexní sacharidy podporují růst rodů *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a *Clostridium*. Nestrávené bílkoviny podporují růst rodu *Bacteroides* a *Clostridium*. Naopak tuk možná snižuje počty bakterií patřících do rodů *Bacteroides*, *Clostridium* a *Bifidobacterium*; zatímco polyfenoly obecně potlačují rody *Bacteroides* a *Clostridium*, ale zvyšují počty rodu *Bifidobacterium*. Z toho vyplývá, že stravovací návyky mohou být hlavním determinátem určující složení střevní mikrobioty (LEE 2013). Pomocí úpravy stravy lze vyvolat změny ve střevní mikrobiotě.

Nestravitelné sacharidy – vláknina

Vláknina jsou buď polysacharidy s minimálně 10 monomerními jednotkami (MJ), nebo oligosacharidy obsahující mezi 3-9 MJ. Polysacharidy se dále dělí na neškrobové polysacharidy a rezistentní škrob. Oligosacharidy zahrnují rezistentní oligosacharidy, jak je uvedeno na Obrázku 3.



Obrázek 3: Klasifikace potravinové vlákniny (Myhrstad et al. 2020).

Vlákninou se rozumí všechny látky rostlinného původu, které nejsou rozkládány enzymy lidského trávicího ústrojí. Vlákna je součástí obilovin, ovoce, zeleniny, luštěnin a ořechů. Vlákna se dělí dle rozpustnosti – na rozpustnou a nerozpustnou vlákninu. Nerozpustná vlákna obsahuje hlavně celulózu, některé hemicelulózy, lignin, chitin, chitosan a vosk. Ovlivňuje střevní peristaltiku a urychluje průchod potravy tlustým střevem. Mezi vlákninu rozpustnou patří pektiny, některé hemicelulózy, glukany, inulin a jiné. Rozpustná vlákna snadno absorbují vodu, je schopná bobtnat a slouží jako živina pro střevní bakterie. Významným způsobem ovlivňuje mikrobiotu tlustého střeva a má tedy prebiotické účinky (Chassard & Lacroix 2013; Deehan et al. 2017; Makki et al. 2018).

Prebiotika jsou nově podle Mezinárodní vědecké asociace pro probiotika a prebiotika (ISAPP) definována jako substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, které poskytují zdravotní přínos (Gibson et al. 2017). Stimulují růst a metabolické aktivity bakterií v tlustém střevě, a tím zlepšují zdraví hostitele (Gibson & Roberfroid 1995). Aby byla prebiotika účinná, musí být odolná trávení v horní části gastrointestinálního traktu a být přednostně využívána prospěšnými mikroby, které jsou součástí střeva tlustého. Fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy jsou dvě důležité skupiny prebiotik, které jsou fermentovány rody *Bifidobacterium* (Manning & Gibson 2004). Prebiotika mají stejný cíl jako probiotika, což je zlepšení zdraví hostitele formováním střevní mikrobioty, i když jiným mechanismem (Manning & Gibson 2004).

Vlákna je bakteriální fermentací přeměňována na metabolity jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA). Mezi SCFA patří kyselina octová, propionová, máselná. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem dodávají energii střevním epitelovým buňkám, mohou být absorbovány do krevního oběhu a ovlivňovat metabolickou regulaci v hostiteli, nebo slouží jako substrát pro jiné mikroby (Myhrstad et al. 2020).

Rezistentní škrob je kvantitativně jeden z hlavních dodaných komplexních polysacharidů prostřednictvím stravy. Lidé vylučují enzymy (amylázu a glukoamylázu) degradující škrob, s výjimkou rezistentního škrobu (Ze et al. 2012). Také u neškrobových polysacharidů (NSP), včetně polysacharidů rostlinných buněčných stěn (celulóza, hemicelulóza, lignin) a některých zásobních sacharidů (pektin a oligosacharidy), dochází k fermentaci až v tlustém střevě (De Filippo et al. 2010). U kojenců bývá zdrojem velkého množství různých oligosacharidů mateřské mléko (Marcobal & Sonnenburg 2012).

Monosacharidy a disacharidy jako je laktóza, fruktóza a cukerné alkoholy (sorbitol, laktitol a další) se také mohou dostat až do tlustého střeva a to při střevní malabsorpci nebo při nadměrné konzumaci těchto cukrů, které se široce používají ve zpracovaných potravinách nebo nápojích (Payne et al. 2012).

Tabulka 1.: Sacharidové substráty a bakterie schopné jejich utilizace (Chassard & Lacroix 2013).

Substrát	Bakteriální kmeny
Rezistentní škrob	<i>Ruminococcus, Bacteroides</i>
Hemicelulóza	<i>Roseburia, Bacteroides, Prevotella</i>
Celulóza	<i>Ruminococcus, Bacteroides</i>
Pektin	<i>Bacteroides, Faecalibacterium</i>
Fruktany (inulin a FOS)	<i>Bacteroides, Roseburia, Faecalibacterium, Bifidobacterium</i>
Mléčné oligosacharidy	<i>Bifidobacterium</i>
Laktóza (při malabsorpci)	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>
Fruktóza (při malabsorpci či přejídání)	<i>Bifidobacterium, Roseburia</i>
Cukerné alkoholy	<i>Lactobacillus, Escherichia</i>
Muciny a mukopolysacharidy	<i>Akkermansia, Bacteroides</i>
Bakteriální polysacharidy	<i>Bifidobacterium, Anaerostipes, Prevotella</i>

Bílkoviny

V tlustém střevě podléhají bakteriálnímu rozkladu bílkoviny, které se nestrávily v tenkém střevu. Zbytkové množství bílkovin (až 10 %), které se dostane do tlustého střeva, závisí na množství a druhu zkonsumovaných proteinů (Scott et al., 2013). Část nestrávených bílkovin slouží jako substrát pro růst střevních bakterií. Mezi tyto bílkoviny řadíme elastin, kolagen a albumin. Jako další substrát pro fermentaci slouží mucin, nebo také bílkoviny z odloupaných buněk střevní sliznice (Salminen et al. 1998). Mucin je glykoprotein produkovaný epitelovou tkání. Slouží jako zdroj energie i řadě sacharolytických bakterií, tedy i bifidobakterií. Některé bifidobakterie, ač jsou považovány za probiotické, mohou svou mucinolytickou aktivitou uškodit. Mohou rozkládat mucin, oslabit jeho vrstvu a tím i jeho ochranou funkci. To může mít za následek snadnější přístup patogenů, toxinů a dalších škodlivých látek ke střevní sliznici a případné translokaci (Ruas-Madiedo et al. 2008). Mezi proteolytické bakterie patří zejména rod *Bacteroides* (zejména skupina *B. fragilis*) a také *Clostridium perfringens*, propionibakterie, streptokoky, bacily a stafylokoky (Macfarlane et al. 1986).

Fermentace aminokyselin je využívána jako zdroj energie pro bakterie. Dochází k ní v distálním tlustém střevě v části, kde se vyčerpávají zdroje sacharidů (Hamer et al. 2012). Mezi druhy preferující fermentaci aminokyselin můžeme řadit *Peptococcus* spp., *Acidaminococcus* spp., *Veillonella* spp. a některé fusobakterie, eubakterie a klostridie (Macfarlane et al. 1997). Při fermentaci aminokyselin dochází k deaminaci, která vede k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a amoniaku (Cummings & Macfarlane 1991; Scott et al. 2013). Většina vyprodukovaného amoniaku se vstřebává, metabolizuje v játrech a vyloučí se močí. Pokud není vstřebán, mění strukturu střevních tkání a může působit jako karcinogen (Scott et al. 2013).

Tuky

Tuky se převážně vstřebávají v tenkém střevě. Při zvýšené konzumaci tuků není schopné tenké střevo všechny tuky emulgovat a absorbovat, což umožňuje jejich vstup do střeva tlustého (Iqbal & Hussain 2009).

Několik studií ukázalo, že strava s vysokým obsahem tuku vede k významným změnám ve střevní mikrobiotě. Například studie Cani et al. (2007) ukázala, že strava s vysokým obsahem tuku souvisí s vyššími hladinami lipopolysacharidů v plazmě a přispívá tak zánětu, inzulinové rezistenci a cukrovce 2. typu spojenou s obezitou. U jedinců konzumujících vysoké množství tuků byly zaznamenány nižší množství bifidobakterií.

U jedinců konzumujících vysoké množství tuků je sledován pokles rozmanitosti mikrobioty. Zároveň jsou však v nízkém množství konzumovány sacharidy a vláknina. Jak již bylo zmíněno výše, sacharidy a vláknina mají významný vliv na mikrobiální složení. U takových studií není jasné, zda rozhodujícím faktorem složení mikrobioty je zvýšený příjem tuku nebo snížený obsah sacharidů (Scott et al. 2013).

3.2.5 Probiotika

Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika (ISAPP) definují probiotika jako „živé mikroorganismy, které, pokud jsou konzumovány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos“ (Hill et al. 2014). Zlepšují rovnováhu střevní mikrobioty, která je důležitá pro udržení homeostáze ve střevech.

Ilja Mečnikov, známý ruský biolog, počátkem 20. století přišel s názorem, že dlouhověkost obyvatel balkánských států byla způsobena vysokým a pravidelným příjmem bakterií mléčného kvašení ve formě mléčných fermentovaných výrobků. Tento poznatek je brán jako počátek vědeckého zájmu o přínos mléčných bakterií na lidském zdraví (Metchnikoff & Mitchell 1910).

Termín probiotikum však byl poprvé použit v roce 1965. Pojmenovávaly se tak látky, které byly vylučovány jedním mikroorganismem a stimulovaly růst druhého mikroorganismu (Lilly & Stillwell 1965).

Teprve Fuller (1989) poprvé označil probiotika jako živé mikrobiální doplňky stravy, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiální rovnováhy. Toto definování bylo následovně široce uznáváno.

Většina probiotických mikroorganismů patří do rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Probiotické vlastnosti však mohou mít i jiné bakterie a některé kvasinky (Williams 2010). Přehled nejčastějších probiotických bakterií v Tabulce č. 2. Bakterie mléčného kvašení (nejčastěji rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*) fermentují sacharidy, kdy hlavním konečným produktem je kyselina mléčná (Agrawal 2005).

Tabulka 2.: Přehled probiotických bakterií (Williams 2010).

Bifidobacterium	Lactobacillus	Ostatní
<i>B. longum</i> (<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> a <i>infantis</i>)	<i>L. acidophilus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>B. animalis</i> (<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> a <i>animalis</i>)	<i>L. johnsonii</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>B. adolescentis</i>	<i>L. gasseri</i>	
<i>B. breve</i>	<i>L. paracasei</i> Shirota	
	<i>L. casei</i> <i>defensis</i>	
	<i>L. rhamnosus</i>	
	<i>L. reuteri</i>	
	<i>L. plantarum</i>	

Ideální probiotikum by mělo obsahovat mikroorganismy, které se přirozeně vyskytují v trávicím traktu u stejného živočišného druhu a měly by být izolovány od zdravých jedinců (Shewale et al. 2014). Mikroorganismy používané v probiotických přípravcích by měly být obecně uznávány jako bezpečné a životaschopné. Důležité je, aby se do místa, kde působí, dostaly v dostatečném počtu (Shewale et al. 2014). Počty probiotik se měří v jednotkách tvořících kolonie (KTJ), které udávají počet životaschopných buněk. Podle těchto autorů je doporučená dávka 5×10^9 KTJ/den, po dobu alespoň pěti dnů (Gupta & Garg 2009). Probiotika by měla mít efektivní účinky a být tedy funkční. Zároveň by měly také splňovat základní kritéria, která shrnuje tabulka 3 (Shewale et al. 2014).

Probiotické mikroorganismy by měly být odolné vůči žluči, kyselině chlorovodíkové a pankreatické šťávě. Kmeny musí být schopné přežít různé fyzikálně-chemické, enzymatické a mikrobiální stresy při průchodu celým gastrointestinálním traktem. Schopnost adheze ke střevnímu epitelu je další důležitou vlastností, stejně jako produkce kyseliny mléčné (Vimala & Kumar 2006).

Probiotika mají příznivé účinky na zdraví hostitele. Zlepšují intestinální mikrobiální rovnováhu a stimulují produkci butyrátu, který podporuje růst epiteliálních buněk tlustého střeva, to umožňuje lepší absorpci živin. Produkují také různé konečné metabolické produkty s antagonistickými vlastnostmi proti patogenům. Mezi tyto produkty patří baktericidní proteiny a metabolity podobné antibiotikům nazývané bakteriociny. Mohou mít i antikarcinogenní aktivitu a stimulují imunitní systém (Markowiak & Ślizewska 2017).

Tabulka 3.: Základní kritéria pro výběr probiotik (Vimala & Kumar 2006).

Základní kritéria pro probiotické mikroorganismy
Vysoká životaschopnost, odolnost vůči nízkému pH a kyselinám
Schopnost přetrvávat ve střevech
Adheze ke střevnímu epitelu
Původ zdroje probiotického kmene
Nepatogenní
Odolnost proti technologii zpracování
Odolnost proti antibiotikům
Antioxidační aktivita
Stimulace produkce protilátek

Mechanismus působení probiotik

Probiotika působí prostřednictvím nespecifických, druhově specifických a kmenově specifických mechanismů (Hill et al. 2014). Mechanismy se velmi liší mezi rody, druhy, a dokonce kmeny běžně používaných probiotických mikroorganismů. Mezi tyto mechanismy patří inhibice růstu patogenních mikroorganismů v trávicím traktu (podpora kolonizační rezistence, zlepšení střevního průchodu nebo normalizace narušené mikrobioty), produkce bioaktivních metabolitů (např. mastných kyselin s krátkým řetězcem) a redukce pH v tlustém střevě (Reid et al. 2011; Kumar et al. 2013). Druhově specifické mechanismy mohou zahrnovat syntézu vitamínů, posílení bariéry střev, metabolismus žlučových solí, enzymatickou aktivitu a neutralizaci toxinů. Kmenově specifické mechanismy, které jsou vzácné a byly zaznamenány pouze u několika kmenů daného druhu, zahrnují produkci cytokinů, imunomodulaci a účinky na endokrinní a nervový systém. Prostřednictvím všech těchto mechanismů mohou mít probiotika široké dopady na zdraví a nemoci (Hill et al. 2014).

3.2.6 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které zpomalují růst či množení mikroorganismů, jsou tedy bakteriostatická, anebo tyto mikroorganismy přímo usmrcují, tedy jsou baktericidní (Beneš 2018). Léčba antibiotiky může ovlivnit nejen cílový patogen, ale také může mít dopad i na prospěšné bakterie. Rozsah dopadu na necílové mikrobiální populace závisí na konkrétním použitém antibiotiku, jeho způsobu účinku a míře rezistence střevních bakterií. Podávání antibiotik může vést k dysbalanci střevního traktu. Nerovnováha v mikrobiální populaci způsobuje řadu střevních problémů, jako je například průjem a v poslední době je zkoumán možný negativní vliv na Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu (Mcfarland 1998; Ojetti et al. 2009). Dalším problémem je zvýšení odolnosti vůči antibiotikům, a tedy potenciální rezistence patogenních bakterií.

Snížení populace bifidobakterií, ke kterému dochází při léčbě antibiotiky (Gewolb et al. 1999; Bennet et al. 2002; Penders et al. 2006), může mít nepříznivé účinky na zdraví hostitele. Tato skutečnost bývá spojována s vyšší citlivostí na enteropatogenní bakteriální infekci

(Collier-Hyams & Neish 2005). Dle Hussey et al. (2011) i krátkodobá léčba antibiotiky snižuje počty bifidobakterií. Kojenci, kteří byli léčeni antibiotiky, vykazovali ve srovnání s kontrolní skupinou snížení počtů, i rozmanitosti bifidobakterií. Potlačení rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* by mohlo usnadnit růst potenciálně patogenních bakterií, jako jsou rody *Klebsiella* a *Clostridium*.

Antibiotika mohou mít negativní dopad na imunitu i zdraví. Vyhýbání se antibiotikům však často není možné, protože mnoho infekcí může být vyléčeno pouze jejich podáváním. Ke snížení nepříznivých změn ve střevní mikrobiotě, které byly způsobeny antibiotickou léčbou, se v současné době využívá suplementace probiotiky. Pro zvýšení účinnosti probiotik je vhodná jejich konzumace spolu s prebiotiky, kterým říkáme symbiotika (Dudek-Wicher et al. 2018). Rovněž se doporučuje zvýšit příjem tradiční fermentované zeleniny a mléčných výrobků. Jako způsob léčby zánětlivých střevních onemocnění způsobených mikrobiální dysbalancí může být také transplantace fekální mikrobioty. Tato metoda je stále více přijímána jako účinná a bezpečná intervence u pacientů s recidivující infekcí bakterie *Clostridium difficile* a ve fázi klinického testování je její účinnost proti zánětlivému onemocnění střev, obezitě a metabolickému syndromu. Kolonizace střeva zdravými bakteriemi ze stolice dárce je schopná v některých případech plně vyléčit tyto nemoci (Gupta et al. 2016; Leszczyszyn et al. 2016).

Nejsou to pouze antibiotika, která narušují stabilitu střevní mikrobioty. Vliv na střevní mikroby mohou mít i jiná léčiva. Role léků ve složení střevního mikrobiomu má pravděpodobně větší vliv, než se v minulosti očekávalo. To může hrát důležitou roli při vývoji léčiv, zejména když vezmeme v úvahu rostoucí spotřebu léčiv (Maier & Typas 2017; Weersma et al. 2020).

3.2.7 Teorie enterotypů

Enterotyp je klasifikace společenstva bakterií, které dominují z hlediska osídlení střevní mikrobioty daného jedince (Arumugam et al. 2011). Za pomoci sekvenčních technologií byly analyzovány vzorky lidských fekálií a na základě výsledků taxonomického složení bylo odhaleno, že existují tři robustní klastry označované jako „enterotypy“. Byly popsány jako „hustě osídlené oblasti ve vícerozměrném prostoru“ a byly nezávislé na věku, pohlaví, kulturním zázemí a geografii (Arumugam et al. 2011). Každý ze tří enterotypů je identifikovatelný převažujícími bakteriálními rody. U enterotypu 1 převažuje rod *Bacteroides*, u enterotypu 2 rod *Prevotella* a u enterotypu 3 dominuje rod *Ruminococcus*.

Zdá se, že bakterie jednotlivých enterotypů však získávají energii z jiných druhů potravin. Enterotyp 1 tedy rod *Bacteroides*, vyskytující se společně s *Parabacteroidetes* získávají energii hlavně z fermentace sacharidů. Tyto rody mají velmi široký sacharolytický potenciál.

Rod *Prevotella* typický pro enterotyp 2, se vyskytoval společně s rodem *Desulfovibrio*. Tento enterotyp získává energii rozkladem mucinové glykoproteinové vrstvy střevní sliznice.

Zatímco enterotyp 3 s rody *Ruminococcus* a *Akkermansia* vážou muciny a degradují základní cukry. Navíc enterotypy 1 a 2 jsou významné tím, že jsou schopné biosyntézy různých vitamínů.

Tímto se však opět dostáváme ke kapitole zabývající se stravou a jejím vlivem na složení střevní mikrobioty. Pokud jedinci konzumující velké množství bílkovin a tuků mají převážně

bakterie rodu *Bacteroides*, zatímco ti, co konzumují více sacharidů a vlákninu, tak u nich převládají rody *Prevotella* (Arumugam et al. 2011).

S přibývajícými studiemi zaměřených na stratifikaci lidské střevní mikrobioty se však vyvrací existence tří enterotypů. Nové analýzy založené na použití více metod zkoumající stejné vzorky odhalují pouze dva enterotypy (Wu et al. 2011; Koren et al. 2013; Liang et al. 2017).

Ve studii Wu et al. (2011) bylo zkoumáno 98 vzorků od zdravých jedinců, ty pak následně byly analyzovány pomocí metody sekvenování a většina výsledků odhalila právě dva enterotypy. Tvrdí, že třetí enterotyp *Ruminococcus* bývá často spojován s enterotypem 1 *Bacteroides*. Několik dalších studií (Lim et al. 2014; Zhang et al. 2014; Nakayama et al. 2017) potvrdilo, že podle profilů mikrobiomu lze vzorky stratifikovat pouze do dvou enterotypů představujících *Bacteroides* a *Prevotella*. Dominance *Ruminococcus* je pravděpodobně způsobena výživou bohatou na rostlinnou stravu- tedy vegetariánství a veganství (Wu et al. 2011).

Je na zvážení, zda by mělo být opuštěno od enterotypu 3, pro který je typický rod *Ruminococcus*, nebo by měl být tento rod připojen k enterotypu *Bacteroides* či *Prevotella*.

3.3 Bifidobakterie

Bifidobakterie jsou hlavním předmětem zkoumání této práce, jak je již patrné z názvu. Tato kapitola se bude zabývat právě bifidobakteriemi jakožto přirozeně se vyskytující bakterie v trávicím traktu savců. Bakterie rodu *Bifidobacterium* napomáhají optimalizovat složení střevní mikrobioty a taktéž se tento rod vyskytuje v nejpoužívanějších probiotičích.

První zmínka o bifidobakteriích se datuje do roku 1900, kdy Tissier (1900) objevil ve stolici kojených dětí tyčinkovité, grampozitivní, anaerobní bakterie s morfologií, kterou nazval *Bacillus bifidus*. Na začátku 20. století, Orla-Jensen (1924), klasifikoval *Bacillus bifidus* jako část čeledi Lactobacteriaceae, které produkují kyselinu mléčnou. V roce 1924 se je pokusil navrhnout jako samostatný rod. Různé druhy bifidobakterií dle Orla-Jensena: „bezpochyby tvoří samostatný rod, případně tvoří spojovací článek mezi bakteriemi mléčného kvašení a bakteriemi produkující kyselinu propionovou“.

Jedna z počátečních studií, která vedla k oddělení bifidobakterií od laktobacilů byla z roku 1957 od Dehnerta. Ten navrhl rozdělení bifidobakterií do pěti skupin na základě fermentace cukrů. Podrobnější studie byla publikována v roce 1963 Reuterem. V tomto experimentu izoloval sedm nových druhů bifidobakterií ze stolice dětí, dospělých a dospívajících a pomocí fermentačních a sérologických charakteristik je identifikoval. Výsledkem byla izolace těchto druhů: *B. infantis*, *B. parvulorum*, *B. breve*, *B. liberorum*, *B. lactentis*, *B. adolescentis* a *B. longum*.

Potvrzení Reuterovy práce poskytl Japonský vědecký pracovník Mitsuoka, který do *B. longum* přidal nový biotyp druhu (*B. longum* subsp. *animalis* a) a poprvé izoloval dva nové druhy *B. thermophilum* a *B. pseudolongum* ze stolice prasete, kuřete, telete a krysy (Scardovi & Trovatielli 1974).

Kvůli morfologickým a fyziologickým vlastnostem, které jsou podobné laktobacilům, byly bifidobakterie většinu 20. století klasifikovány jako součást rodu *Lactobacillus*. Teprve v poslední době byly uznány jako odlišný rod. V současné době se rod *Bifidobacterium* skládá

z 37 druhů se čtyřmi taxony (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium thermacidophilum*), které se dále dělí na poddruhy, přičemž všechny vykazují více než 93% identitu svých 16S rDNA sekvencí (Yoon et al. 1998). V poslední době byly z trávicího traktu čmeláka izolovány tři nové druhy, tj. *Bifidobacterium actinocoloniiforme*, *Bifidobacterium bohemicum* a *Bifidobacterium bombi* sp. nov. (Killer et al. 2011).

3.3.1 Charakteristika rodu

Bifidobakterie jsou grampozitivní, anerobní, nesporotvorné a nepravidelné tyčinky (Bergey et al. 1974). Typické prostředí pro tento rod je střevní trakt člověka a zvířat, odpadní vody a mléčné výrobky (Turrone et al. 2011). Taxonomicky se rod *Bifidobacterium* řadí do kmene Actinobacteria.

Většina lidských kmenů bifidobakterií roste při teplotě 36–38 °C, zatímco u zvířecích kmenů se zdá, že jejich optimální teplota je mírně vyšší 41–43 °C, s výjimkou druhu *B. thermacidophilum*, jehož maximální růstová teplota je 49,5 °C (Dong et al. 2000) a druh *B. psychraerophilum*, u kterého bylo prokázáno, že je schopen růstu i při teplotě 4 °C (Simpson et al. 2004).

Bifidobakterie jsou mikrobi odolné vůči kyselinám a jejich optimální hodnota pH pro růst je mezi 6,5 a 7,0. Druh *B. animalis* s poddruhem *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* mohou přežít expozici při pH 3,5 (Matsumoto et al. 2004). V prostředí, kde hodnota pH přesahuje 8,5, s největší pravděpodobností nepřežijí žádné bakterie (Biavati et al. 2000).

Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy a hrají důležitou roli při fermentaci sacharidů v tlustém střevě. Bifidobakterie mohou fermentovat různé komplexní zdroje uhlíku, jako je mucin, xylooligosacharidy, galaktooligosacharidy, sojové oligosacharidy, fruktooligosacharidy, maltooligosacharidy, pektin a jiné oligosacharidy odvozené od rostlin. Schopnost metabolizovat konkrétní sacharidy však záleží na druhu a kmeni. Obecně střevní bakterie degradují polymerní uhlohydráty na oligosacharidy s nízkou molekulovou hmotností, které mohou být následně degradovány na monosacharidy. V případě bifidobakterií se tyto monosacharidy přeměňují přes hexosové fermentační dráhy, na meziprodukty nazývané jako fruktóza-6-fosfát a nakonec jsou převedeny na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) a další organické sloučeniny (Gomes & Malcata 1999; Biavati et al. 2000; Pokusaeva et al. 2011).

3.3.2 Vliv bifidobakterií na zdraví a nemoci

Přítomnost rodu *Bifidobacterium* v trávicím traktu má spoustu pozitivních účinků na zdraví jedince (O'Callaghan & van Sinderen 2016). V následující tabulce 4. je přehled zdraví prospěšných vlastností bifidobakterií.

Tabulka 4.: Zdraví prospěšné vlastnosti (Vlková et al. 2002; Markowiak & Ślizewska 2017).

Zdraví prospěšné vlastnosti
Prevence průjmových onemocnění
Zmírnění laktóзовé intolerance
Snížení hladiny cholesterolu
Snížení rizika nádoru
Aktivace imunitního systému
Produkce vitamínů
Zmírnění zácpy
Prevence zánětlivého onemocnění střev

3.3.3 Identifikace Bifidobakterií

Identifikace na úroveň rodu či kmenu je důležitá pro odlišení bifidobakterií od ostatních bakterií nacházejících se v trávicím traktu, nebo mléčných výrobcích. Pokud chceme bakterie využít jako probiotika, je důležitá přesná identifikace, a to na úrovni kmene.

Rod *Bifidobacterium* lze od jiných bakteriálních rodů odlišit za pomoci enzymu fruktóza-6-fosfátfosfoketoláza (F6PPK). Detekce F6PPK v buněčných extraktech se považuje za nejspolehlivější určení. Principem je reakce, při které se z fruktózo-6-fosfátu vytváří acetylfosfát a dochází k červenofialovému zbarvení, napovídajícímu tomu, že bakterie patří do rodu *Bifidobacterium* (Gavini et al. 1996). Metoda však neumožňuje mezidruhové rozdělení.

Pro mezidruhové rozdělení lze využít genetických metod za použití specifických PCR primerů. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) je v poslední době používána pro sledování mikrobiot ve stolici zvířat a lidí. Vzhledem k roli bifidobakterií jako probiotik byla velká pozornost zaměřena právě na qPCR (Mathys et al. 2008). Ukázalo se, že qPCR je vysoce citlivou metodou pro detekci bifidobakterií ze vzorků stolice bez potřeby jejich předchozí kultivace a izolace (Mathys et al. 2008).

V poslední době se bakteriologové zaměřili na identifikaci bakterií pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) konkrétně metodou MALDI–TOF (laserová desorpce a ionizace za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Je to metoda přesná, rychlá a aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů, ale pouze v případě, že existuje databáze (Huong et al. 2014). MALDI–TOF má schopnost rozlišit bakterie či jiné mikroorganismy na úrovni rodu, druhu, a v některých případech dokonce i kmene (Hrabák et al. 2013).

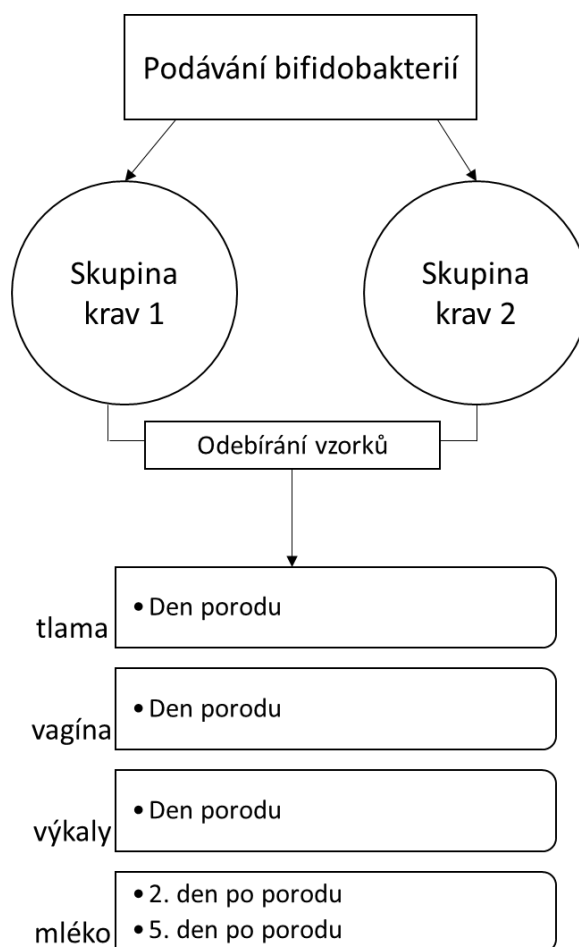
4 Metodika

4.1 Průběh experimentu

Experiment zaměřující se na kolonizaci byl prováděn na kravách plemene Holštýn jakožto modelovém zvířeti. Telata nemají rozvinutý bachor, takže hlavním místem mikrobiálního trávení bude tlusté střevo, stejně jako u lidí.

Experiment probíhal v Uhelné Příbrami na Mléčné farmě, patřící ZS Vilémov a.s. Farma s celkovou kapacitou 1200 kusů krav. Experiment probíhal na porodně, kde jsou ustájeny krávy 14 dní před plánovaným otelením v kotcích. Kravám bylo podáváno 250 ml kysaného mléka jednou denně od 4. dne před plánovaným otelením do porodu. Mléko bylo prokysáno kmenem rifampicin rezistentních bifidobakterií (RRBIF) *B. animalis* ssp. *animalis* 23II. Kysané mléko bylo kravám podáváno přímo do krku.

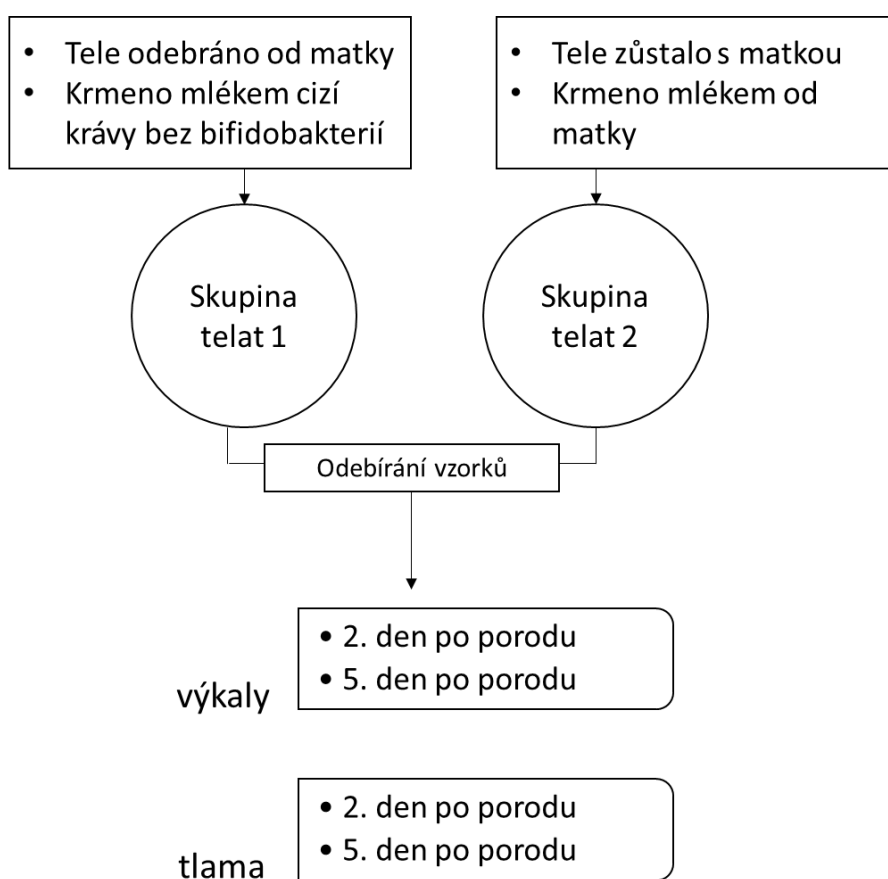
Stěry z tlamy, vagíny a odběr výkalů z rekta byl kravám proveden v den porodu. Tyto vzorky v množství 1 g byly odebírány do zkumavek s Wilkins-Chalgren bujónem a přísadkou glycerinu v poměru 6 ml bujónu a 3 ml glycerinu (Tabulka č. 5) a paralelně do zkumavek Ependorf v množství 0,5 g k izolaci DNA a její následné analýze. Vzorky byly ihned po odběru zamrazeny a uchovány k dalšímu zkoumání.



Obrázek 4: Schéma experimentální části u krav

Krávy byly rozděleny na dvě skupiny. Oběma skupinám bylo podáváno kysané mléko s kmenem RRBIF. První skupině krav (Skupina 1; n=4) bylo tele okamžitě po porodu odebráno a nakrmeno mlezivem jiné krávy, kterým nebyly bifidobakterie podávány. Druhé skupině krav (Skupina 2; n=6) byla telata ponechána po dobu 24 hod. a bylo jim umožněno sát mlezivo přímo od matky. Tato telata mohla interagovat s prostředím, byla olizována matkou a nebyla vystavena stresové situaci. Skupina krav 1 odpovídá skupině telat 1 a skupina krav 2 odpovídá skupině telat 2.

Druhý den po porodu byl proveden odběr vzorku mléka oběma skupinám krav. Telatům byl proveden stěr z dutiny ústní, zubního plaku a odebrán vzorek výkalu. Postupovalo se stejným způsobem, jako je popsáno výše. Totéž odebrání vzorků bylo provedeno i 5. den po porodu.



Obrázek 5: Schéma experimentální části u telat

4.2 Mikrobiologická část

Pro mikrobiologický rozbor vzorků byla použita kultivační desková metoda. Počty bakterií byly stanovovány na selektivních polotuhých pěstebních médiích. Jednalo se o média Wilkins-Chalgren agar, používaný pro stanovení celkového počtu anaerobních bakterií, dále pro stanovení bifidobakterií bylo využito dvou typů agarů (agar N a B). Základem obou typů je Wilkins-Chalgren agar, kdy do agaru B byla navíc přidána ledová kyselina octová (1 ml/l), mupirocin (100 mg/l). Složení agaru N bylo stejné jako agaru B, ale byl navíc přidán norfloxacin (200 mg/l). Pro rifampicin rezistentní bifidobakterie byl použit agar B s přidavkem rifampicinu (100 mg/l). Rogosa agar byl použit pro stanovení laktobacilů. *E. coli* a koliformní bakterie byly stanoveny na TBX agaru. Veškerá práce byla provedena asepticky (Vlková et al. 2015).

4.2.1 Příprava kultivačních médií a kultivace

První ředění bylo vytvořeno tak, že 1 g vzorku byl umístěn do zkumavky s glycerinem (tedy již při odběru vzorku byl vzorek naředěn v poměru 1:9), čímž bylo vytvořeno ředění 10^{-1} . Dále byla vytvořena ředící řada stejného média do konečného poměru $1:10^{-8}$ g/ml, kdy vzorek byl rutinně ředěn do vialek s 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid). Tzn., z ředění 10^{-1} byl asepticky odebrán stříkačkou a jehlou 1 ml suspenze a byl převeden do další vialky, vzniklo ředění 10^{-2} . Dále se postupovalo stejně až do vytvoření ředění 10^{-8} . Na přípravu každého ředění bylo nutné použít vždy novou stříkačku a jehlu. Pracovalo se tak, aby do vzorku nevnikaly vzduchové bubliny. Bujóny pro ředící řady byly připraveny metodou roll-tube, kdy se dané médium probublá oxidem uhličitým k zajištění anaerobního prostředí. Příslušné naředěné vzorky byly umístěny (postupovalo se od nejvyššího ředění a používala se jedna stříkačka a jehla) na Petriho misky ve dvou opakováních a byly okamžitě zalaty selektivními půdami.

Pro stanovení bifidobakterií byly použity dva typy agarů (agar B a N), kdy základ tvořil Wilkins-Chalgren agar (Oxoid; WSPMup). Agar B měl navíc přidanou ledovou kyselinu octovou (1 ml/l), mupirocin (100 mg/l) a do agaru N byla přidána ledová kyselina octová (1 ml/l), mupirocin (100 mg/l) a norfloxacin (200 mg/l). Pro rifampicin rezistentní bifidobakterie byl použit agar B s přidavkem rifampicinu (100 mg/l) zředění bylo 10^{-2} až 10^{-5} . Podrobné složení agaru je v tabulce 5. Půda svým složením podporuje růst bifidobakterií a mupirocin potlačuje rozvoj bakterií mléčného kvašení. Misky pro kultivaci bifidobakterií byly přelity vrstvou agaru a ihned byly umístěny do anaerostatu společně s vyvíječem anaerobní atmosféry (Anaerogen, Oxoid).

Pro detekci laktobacilů byl použit Rogosa agar (Oxoid) tabulka 6. Selektivně v médiu působí pH, jehož hodnota byla upravena na 5,4 kyselinou octovou. Tímto způsobem byl podpořen růst laktobacilů, zatímco ostatní bakterie mléčného kvašení byly potlačeny. Kultivace probíhala v mikroaerofilním prostředí, které bylo zajištěno dvojí vrstvou agaru. Suspenze bakterií byla přelita první vrstvou agaru a po jejím zatuhnutí byla miska přelita další vrstvou agaru. Po zatuhnutí byly misky umístěny dnem vzhůru do termostatu. Ve všech případech probíhala kultivace 48-72 hodin při teplotě 37 °C.

Pro stanovení počtu koliformních bakterií a *Escherichia coli* ve vzorcích bylo použito TBX médium viz tabulka 7. Trypton Bile agar s přidavkem chromogenního činidla X-glukuronidu, který detekuje aktivitu glukuronidázy, což je enzym specifický pro *E. coli*. Chromogen X-glukuronid jsou *E. coli* schopny absorbovat a glukuronidáza štěpí vazbu mezi chromoforem a glukuronidem. Uvolněný chromofor je zbarven a hromadí se v buňkách, což způsobuje, že kolonie *E. coli* jsou zbarveny modře nebo zeleně.

Tabulka 5.: Složení Wilkins-Chalgren bujónu a agaru

Wilkins-Chalgren bujón/agar	
Trypton	10 g
Pepton	10 g
Glukosa	1 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	5 g
L – arginin	1 g
Na – pyruvát	1 g
Menadion	0,5 mg
Hemin	5 mg
Agar*	10 g

* pouze u Wilkins-Chalgren agaru

Tabulka 6.: Složení Rogosa agaru

Rogosa agar	
Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukosa	20 g
Tween 80	1 ml
Dihydrogenfosforečnan draselný	6 g
Citrát amonný	2 g
Acetát sodný	17 g
Síran hořečnatý	0,575 g
Síran manganatý	0,12 g
Síran železitý	34 mg
Agar	20 g
Voda	1000 ml
pH	5,4 ± 0,2 při 25 °C

Tabulka 7.: Složení TBX agaru

TBX agar	
Trypton	20 g
Žlučové soli	1,5 g
X-glukuronid	75 mg
Agar	15 g
Voda	1000 ml
pH	7,2 ± 0,2 při 25 °C

Vyhodnocení rozboru

Vyhodnocení vzorků bylo provedeno následovně. Byly spočítány narostlé kolonie na jednotlivých půdách (každá spočtená kolonie byla označena lihovým popisovačem). Konečné množství bakterií P bylo vypočteno dle vztahu (1) a výsledky byly vyjádřeny jako počet kolonie tvořících jednotek v 1 ml vzorku (KTJ/ml) v logaritmickém tvaru.

$$P = \frac{(P1 + P2)}{11} * F \quad (1)$$

$P1, P2$ – počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počítatelných plotnách
 F – převrácená hodnota vyššího ředění

4.3 Vyhodnocení

Vyhodnocení výsledků získaných mikrobiologickým rozbořem bylo na základě statistických metod. Pro navržený experiment byl nejvhodnější Studentův t – test, na jehož základě byl určen statisticky významný rozdíl mezi experimentálními skupinami. Statisticky významný rozdíl byl určen na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. P bylo použito pro dosaženou hladinu významnosti. Pro zpracování výsledků byl využit program Statgraphics Centurion 19.

5 Výsledky

Během experimentu bylo kravám podáváno kysané mléko s kmenem rifampicin rezistentních bifidobakterií. Následně byly odebrány vzorky, ve kterých byly sledovány celkové počty anaerobních bakterií, rifampicin rezistentních bifidobakterií, laktobacilů, *E. coli* a koliformních bakterií pomocí kultivační metody. Výsledné hodnoty jsou uvedené v následujících podkapitolách.

5.1 Porovnání matek

Z experimentu na matkách byly získány hodnoty počtů bakterií a pokusné skupiny krav byly mezi sebou statisticky porovnány. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8.: Počty bakterií stanovené ve vzorcích výkalů, tlamy, vagíny a mléka pokusných krav (výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka log KTJ/g).

Vzorek		CP	BIF	Nor	LB	EC - M	EC - B	RRBIF
Výkaly 1. den porodu	Skupina 1	7,70 ± 0,46*	5,68 ± 0,56	5,68 ± 0,70	4,85 ± 1,01	4,70 ± 1,18	3,79 ± 0,84	3,48 ± 1,28
	Skupina 2	7,16 ± 0,72*	5,89 ± 1,09	5,92 ± 1,19	4,44 ± 0,39	3,87 ± 1,70	3,60 ± 0,61	2,92 ± 1,12
Tlama 1. den porodu	Skupina 1	5,46 ± 1,04	2,96 ± 1,45**	2,69 ± 1,12	3,87 ± 1,48	2,25 ± 0,83***	2,80 ± 1,13	2,45 ± 1,27
	Skupina 2	5,51 ± 0,55	4,29 ± 0,73**	2,98 ± 1,50	4,38 ± 1,00	1,00 ± 0,00***	2,21 ± 1,26	2,82 ± 0,89
Vagína 1. den porodu	Skupina 1	5,88 ± 0,38	3,25 ± 1,16	2,92 ± 1,58	2,13 ± 1,27	3,44 ± 1,38***	2,51 ± 1,37*	1,60 ± 0,73*
	Skupina 2	6,10 ± 1,38	3,48 ± 2,06	2,83 ± 2,12	2,03 ± 0,89	1,33 ± 0,49***	1,46 ± 0,72*	1,18 ± 0,31*
Mléko 2. den po porodu	Skupina 1	2,11 ± 0,98	1,69 ± 0,88	1,25 ± 0,43	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,08 ± 0,18
	Skupina 2	2,19 ± 0,94	1,42 ± 0,52	1,40 ± 0,59	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Mléko 5. den po porodu	Skupina 1	2,59 ± 0,45	1,50 ± 0,62	1,21 ± 0,49	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Skupina 2	2,57 ± 0,51	1,65 ± 0,62	1,21 ± 0,47	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; Statisticky významné rozdíly mezi skupinou 1 a 2.

CP = celkové počty anaerobních bakterií

BIF = bifidobakterie kultivované na agaru B

NOR = bifidobakterie kultivované na agaru N

LB = laktobacily

EC - M = *E. coli*

EC - B = koliformní bakterie

RRBIF = rifampicin rezistentní bifidobakterie

Z výsledků vyplývá, že největší počet bakterií byl ve výkalech, a naopak nejméně bylo ve vzorcích mléka. Rozdíl selektivity agarů pro stanovení bifidobakterií byl minimální.

Z tabulky lze vyčíst, že hodnoty CP u výkalů skupiny 1 ($7,70 \pm 0,46$ log KTJ/g) a skupiny 2 ($7,16 \pm 0,72$ log KTJ/g) se statisticky významně liší ($P < 0,05$). Počty BIF v tlamě v den porodu byly statisticky významně vyšší ve skupině 2 ($P < 0,01$). Statisticky významně vyšší počty *E. coli* (EC – M) byly ze vzorků tlamy u skupiny 1 ($P < 0,001$). Také EC – M skupiny 1 ze vzorků vagíny byly počty statisticky významně vyšší oproti skupině 2 ($P < 0,001$). U vagíny byly statisticky významně odlišné i koliformní bakterie ($P < 0,05$), kde vyšší byly počty u skupiny 1. Počty rifampicin rezistentních bifidobakterií se statisticky významně lišily pouze ve vzorcích vagíny ($P < 0,05$) a vyšší počty vykazovala skupina 1.

Pod limitem detekce (1 log KTJ/g) vyšly vzorky mléka odebraného 2. den po porodu, tak i mléka odebíraného 5. den po porodu. Jedná se konkrétně o hodnoty LB, EC – M a EC – B u mléka odebíraného 2. den po porodu. U mléka odebíraného 5. den po porodu to jsou hodnoty laktobacilů, *E. coli*, koliformních bakterií a rifampicin rezistentních bifidobakterií.

Rifampicin rezistentní bifidobakterie se nedostaly do mléka. Byly detekovány ve výkalech tudíž se dostaly přes horní část trávicího traktu. RRBIF byly také detekovány ve vzorcích z vagíny. Není tedy potenciál, aby se tyto bakterie dostaly z mléka dál do telete.

5.2 Porovnání telat

Z experimentu na telatech byly získány hodnoty počtů bakterií a pokusné skupiny telat byly mezi sebou statisticky porovnány. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9.: Počty bakterií stanovené ve vzorcích výkalů a tlamy pokusných telat (výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka log KTJ/g).

Vzorek		CP	BIF	Nor	LB	EC - M	EC - B	RRBIF
Výkaly 2. den porodu	Skupina 1	9,31 ± 0,37**	8,84 ± 0,48***	8,76 ± 0,45***	6,61 ± 0,61	7,86 ± 1,08	5,66 ± 2,01	2,73 ± 2,14
	Skupina 2	9,66 ± 0,24**	9,41 ± 0,27***	9,34 ± 0,30***	7,03 ± 1,58	8,43 ± 0,53	6,11 ± 1,58	3,60 ± 1,38
Tlama 2. den po porodu	Skupina 1	4,87 ± 0,92	3,40 ± 1,08	2,16 ± 1,94	1,55 ± 1,14	2,17 ± 1,38	2,77 ± 1,27*	1,00 ± 0,00
	Skupina 2	4,65 ± 0,89	3,47 ± 0,34	2,51 ± 0,89	1,44 ± 0,86	2,12 ± 1,19	1,77 ± 1,13*	1,05 ± 0,13
Výkaly 5. den po porodu	Skupina 1	9,21 ± 0,22***	8,70 ± 0,26***	8,64 ± 0,27***	6,65 ± 0,98	7,96 ± 0,86	6,10 ± 2,20	2,12 ± 0,79***
	Skupina 2	9,70 ± 0,33***	9,39 ± 0,37***	9,35 ± 0,47***	7,44 ± 1,59	7,82 ± 0,53	5,68 ± 2,00	3,73 ± 1,22***
Tlama 5. den po porodu	Skupina 1	5,11 ± 0,45*	3,14 ± 1,19	2,04 ± 1,11	1,54 ± 1,24	1,73 ± 0,86	2,54 ± 1,71*	1,00 ± 0,00
	Skupina 2	4,78 ± 0,40*	3,22 ± 1,14	2,36 ± 1,17	2,00 ± 0,87	1,71 ± 1,04	1,51 ± 0,82*	1,00 ± 0,00

*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; Statisticky významné rozdíly mezi skupinou 1 a 2.

CP = celkové počty anaerobních bakterií

BIF = bifidobakterie kultivované na agaru B

NOR = bifidobakterie kultivované na agaru N

LB = laktobacily

EC – M = *E. coli*

EC – B = koliformní bakterie

RRBIF = rifampicin rezistentní bifidobakterie

Z výsledků vyplývá, že se statisticky významně lišily počty 2. a 5. den po porodu u celkových počtů anaerobních bakterií (CP), bifidobakterií kultivovaných na agaru B a N u výkalů. U CP z výkalů druhý den po porodu byly statisticky významně vyšší počty u skupiny 2 (P < 0,01), taktéž pátý den po porodu byly statisticky vyšší počty u skupiny 2 (P < 0,001). Celkové počty anaerobních bakterií z tlamy pátý den po porodu, byly statisticky vyšší u skupiny 1 (P < 0,05). Bifidobakterie kultivované na agaru B u výkalů druhý den po porodu byly statisticky významně vyšší u skupiny 2 (P < 0,001) a pátý den po porodu byly počty také vyšší u skupiny 2 (P < 0,001). U bifidobakterií kultivovaných na agaru N byly počty statisticky významně vyšší u skupiny 2, a to jak u výkalů druhý den po porodu, tak i u výkalů pět dní po porodu (P < 0,001). U hodnot výkalů z 5. dne po porodu se navíc statisticky významně lišily rifampicin rezistentní bifidobakterie (P < 0,001).

Dále se lišily koliformní bakterie u vzorků ze slin odebíraných 2. i 5. den po porodu ($P < 0,05$), kdy v obou případech byly statisticky vyšší počty u skupiny 1. Pátý den po porodu byly statisticky významně vyšší i celkové počty bakterií ($P < 0,05$) z tlamy u skupiny 1. Pátý den po porodu vyšly pod limitem detekce rifampicin rezistentní bifidobakterie ($< 1 \log \text{KTJ/g}$) v tlamě u obou skupin.

RRBIF nebyly detekovány v tlamě telat druhý ani pátý den po porodu. Významně vyšší byly RRBIF pouze ve výkalech pátý den po porodu u skupiny 2.

6 Diskuze

Mléko představuje ideální výživu pro mláďata. Poskytuje klíčové živiny pro správný růst a vývoj. Kromě komplexních sacharidů, bílkovin a tuků obsahuje také řadu biologicky aktivních látek, jako jsou např.: imunoglobuliny, lysozym a laktoferin. Právě lysozym a laktoferin jsou důležité pro svůj antibakteriální efekt. Probiotické bakterie zejména bifidobakterie se vyznačují svou odolností proti lysozymu. Oligosacharidy mateřského mléka a další aktivní složky se podílí na vývoji mikrobioty. Mléko je svým složením dobrým zdrojem pro růst bifidobakterií u mláďat a zároveň dobrým ukazatelem množství těchto bakterií v těle.

Mateřské mléko se považovalo za sterilní. Předpokládalo se, že bakterie v něm přítomné pocházejí z kontaminace bakteriální expozicí prsu (nebo vemene) nebo ústní dutiny dítěte. Studie Arroyo et al. (2010) zabývající se enteromamální cestou mikrobiálního přenosu zjistili, že podávání laktobacilů vedlo ke kolonizaci mateřského mléka tímto kmenem. Naproti tomu studie (Simpson et al. 2018) zkoumala účinek mateřské suplementace *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5 a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 na mléčnou mikrobiotu a na kojeneckou gastrointestinální mikrobiotu. Ve výsledku dospěli k závěru, že kojení pravděpodobně nebude významným zdrojem těchto probiotik pro kojence. Kromě toho perorální podání matkám významně neovlivnilo celkové složení mléčné mikrobioty.

V případě našeho výzkumu bylo zkoumáno podávání prokysaného mléka kmenem rifampicin rezistentních bifidobakterií (RRBIF) *B. animalis* ssp. *animalis* 23II kravám od 4. dne před plánovaným otelením do porodu.

Výsledky experimentu nenaplnily očekávání hypotézy. Zjistili jsme, že mléko obohacené o bifidobakterie významně neovlivnilo mikrobiotu telat. Bakteriální osídlení bylo značně individuální a pokud byly bifidobakterie schopné přežít v trávicím traktu krávy, objevily se i ve výkalech. Tudíž pokud přežily bifidobakterie u matky, objevily se i u mláďete. Tento experiment však může sloužit jako pilotní studie před hlavním výzkumem, za účelem vylepšení plánu výzkumu. Podávání vybraného kmene rifampicin rezistentních bifidobakterií na zvířecím modelu nemělo negativní dopad na jejich zdraví. Zvolením jiného kmene bifidobakterií by tak tento pokus mohl být aplikován na člověka.

Přežití bifidobakterií při průchodu gastrointestinálním traktem je důležitým faktorem pro následnou identifikaci ve vzorcích. Jak bylo zmíněno výše, pokud chceme, aby se bifidobakterie objevily u mláďete, je nutné jejich přežití v těle matky. Kyselé prostředí žaludku je první bariérou, na kterou bifidobakterie narazí. Další překážku pro tento kmen tvoří antimikrobiální peptidy a je tedy zřejmé, že pro kolonizaci GIT bifidobakteriemi je nutná vysoká adaptabilita na prostředí. Obrana GIT proti patogenním mikroorganismům neboli kolonizační rezistence pravděpodobně způsobila špatnou kolonizaci bifidobakteriemi. Proniknutí skrze silně osídlenou vrstvu mucinu a uchycení na střevním epitelu je pro nové bakterie obtížné. Tato kolonizační rezistence omezuje růst bakteriálních kolonií procházejících GIT (Lawley & Walker 2013). Nutností je vybrat kmen bifidobakterií, který je odolný jak nízkému pH, tak i jiným faktorům bránící kolonizaci a průnik GIT.

Obecně lze pozorovat z výsledků, že telata, která po porodu zůstala s matkou, měla pozorovatelně větší počet bakterií oproti telatům, která byla ihned po porodu matce odebrána. Rifampicin rezistentní mutanti se ve větší míře nedostali do mléka matek. Mléko tudíž nemohlo

být významným zdrojem podaných bifidobakterií. Zdrojem kolonizace byl však pravděpodobněji trávicí trakt a vagína matky než její mléko. Pro stanovení bifidobakterií byla použita dvě média. Identifikací izolátů z těchto médií bylo prokázáno, že agar s norfloxacinem je selektivnější (počty na něm stanovené jsou tedy přesnější) a proto jsou dále popsány výsledky stanovení bifidobakterií na médiu s norfloxacinem. Počty bifidobakterií stanovených na médiu s norfloxacinem byly ve výkalech druhý den po porodu u telat, která zůstala s matkou vyšší $9,34 \pm 0,30$ log KTJ/g oproti skupině telat, které byly matkám odebrány $8,76 \pm 0,45$ log KTJ/g. Také pátý den po porodu byly pozorované vyšší počty bifidobakterií ve výkalech u skupiny telat ponechaných matce. Při porovnání výkalů z druhého dne s pátým dnem, tak u skupiny telat odebraných matce je pozorovatelný mírný pokles počtů bifidobakterií, a naopak u skupiny telat ponechaných s matkou je pozorovatelný nárůst bifidobakterií. U telat, která byla matce odebrána, je opačný trend a to, že bifidobakterie jsou pátý den nižší než v druhý den. Výsledky ze vzorků tlamy u telat nenaznačovaly významný nárůst bifidobakterií ani u jedné skupiny. Nižší počty bifidobakterií u telat, odebraných matce, mohou naznačovat významný vliv stresu na kolonizaci mikrobioty. Tato skupina telat také přišla o interakci s matkou.

Právě stres v raném stádiu života může měnit mikrobiotu a s tím i spojené chování a imunitu. Ve studii Amini-Khoei et al. (2019) se zabývali sociálními vazbami, zejména vztahem matky a dítěte během kojeneckého období. Vztah matka a dítě hraje zásadní roli ve vývoji mozku a chování v dospělosti. Je prokázáno, že expozice novorozenců psychosociálním nepříznivým podmínkám, jako je stres z mateřské separace, porušuje vývoj mozku a zvyšuje riziko neuropsychiatrických onemocnění včetně úzkosti a deprese. Dále separace dítěte od matky, narušuje vývoj a složení střevní mikrobioty. Změny ve složení mikrobioty spolu se zvyšující se propustností střev by mohly vést k nadměrné produkci prozánětlivých cytokinů ve střevě. To je spojeno se skutečností, že existují znatelné interakce mezi stresem, imunitním systémem a střevní mikrobiotou. Stres narušuje homeostázu organismu a aktivuje hypotalamus-hypofýza-nadledvinovou osu (HPA osa). HPA osa je hlavním neuroendokrinním systémem, který reaguje na stres. HPA osa tak reguluje spousty tělesných procesů, včetně trávení. Interakce probíhající mezi stresem, HPA osou a imunitním systémem mohou být zprostředkovány střevní mikrobiotou. Při déle trvajícím stresu dochází k ovlivnění střevní propustnosti a bakterie mohou snadněji prostoupit střevní sliznicí (Molina-Torres et al. 2019).

Mateřský prenatální stres má také dopad na střevní mikrobiotu matky, tak i na jejího potomka. Ve studii Zijlmans et al. (2015) byl zkoumán vývoj střevní mikrobioty u kojenců během prvních 110 dnů života. Výzkum probíhal na 56 vaginálně narozených zdravých kojencích. Výsledky ukázaly, že prenatální stres matky, tj. hlášený stres, nebo zvýšená koncentrace kortizolu ve slinách matky, byl silně a trvale spojen se složením mikrobioty kojenců. Matky během těhotenství měly významně vyšší relativní hojnost skupin proteobakterií, o nichž je známo, že obsahují patogeny (*Escherichia*, *Serratia*, a *Enterobacter*). Zároveň tyto matky měly snížení množství bakterií mléčného kvašení (tj. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*) a bifidobakterie. Tento neobvyklý kolonizační vzorec souvisel s kojeneckými gastrointestinálními příznaky a alergickými reakcemi.

Možností je, že podávání prokysaného mléka bifidobakteriálním kmenem netrvalo dostatečně dlouhou dobu. Pokusným kravám bylo prokysané mléko podáváno po dobu 4 dnů před otelením. Někteří jedinci jsou citlivější než ostatní, proto u nich mohou být naměřené

hodnoty průkaznější. U méně citlivějších jedinců může být vliv bifidobakterií pozorovatelný teprve po delší době. Ve studii Solano-Aguilar et al. (2018) podávali kmen bifidobakterií v délce 21 dní pro pozorovatelné účinky.

Část vzorků vyšla pod limitem detekce. Je pravděpodobné, že tyto vzorky nemusely obsahovat žádné bakterie, nebo mohly být různými způsoby znehodnoceny. Nejčastější chyby nastávají při odběru vzorků, při špatném zacházení, špatném uchování nebo dlouhé přepravě. Další z možností by mohla být chyba při mikrobiologickém rozboru. Dodržení aseptické práce a optimálních podmínek kultivace je nutností pro správný nárůst kolonií.

Vliv na množství bifidobakterií ve vzorcích mohla mít i předchozí léčba pokusných krav antimikrobiálními látkami. Tato léčiva narušují mikrobiotu, ale zároveň se v podobě reziduí mohou dostat do mléka. Ve studii (van Vleck Pereira et al. 2016) se zaměřili na vyhodnocení vlivu požití reziduí léčivých přípravků obsažených v mléce na fekální mikrobiotu odstavených telat. Léky přidané do mléka testovací skupiny telat byly přítomny v toleranci a bezpečném limitu, jak stanovil Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Úrovně tolerance pro léky stanovené FDA se považují za koncentraci, pod kterou látka, pokud je přítomna v potravíně, nebude mít škodlivé účinky na zdraví spotřebitele. Z 210 sekvenovaných vzorků stolice analýza ukázala (s výjimkou vzorků před léčbou), že konzumace mléka obsahující rezidua léčiv ovlivnila složení mikrobiální populace ve stolici. Srovnání početnosti jednotlivých taxonů mezi kontrolní a testovanou skupinou však ukázalo významné rozdíly pouze u několika rodů, přičemž nebyl pozorován žádný rozdíl na úrovni tříd, řádů a čeledí. Tyto výsledky naznačují, že ačkoli rezidua léčiv mohou ovlivňovat mikrobiální populaci na rodové úrovni, tak k narušení nadřazených taxonomických hladin nedochází. Toto zjištění naznačuje, že selektivní dopady reziduí léčiv přítomných v mléce mohou mít účinky na bakteriální složení pouze v případě překročení bezpečnostních limitů.

Další z možností, která by co nejvíce podpořila zdravotní přísnos bifidobakterií a jejich kolonizaci v trávicím traktu v co nejhojnějším množství je genetická modifikace. Prozkoumání bakteriálního genomu, podpoření perzistence v trávicím traktu a následné zlepšení jejich vlastností by bylo možné docílit za pomoci genetické manipulace. Genetické modifikace by mohly zlepšit účinky *in vivo* nebo umožnit sledování požitých probiotických kmenů v modelech zvířat i lidí. Zvyšující se množství sekvencí genomů poskytuje příležitost pro lepší analýzu metabolismu, fyziologie, genetiky a její role při udržování zdraví v trávicím traktu. Velkou překážkou je však nedostatek znalostí o molekulárních mechanismech. Zvyšující se dostupnost sekvencí genomu a genetických nástrojů by v budoucnu mohlo znamenat významný pokrok v používání těchto bakterií pro lékařské účely (Cronin et al. 2011).

Mateřská mikrobiota je jedním z důležitých faktorů ve vývoji imunitního systému dítěte, protože představuje první kontakt dítěte s mikroorganismy. Způsob porodu byl považován za první zdroj k vytvoření si kojenecké mikrobioty, ačkoli nedávné studie uvádějí dřívější mikrobiální kontakt, protože bakterie byly detekovány již v plodové vodě, pupečnickové krvi a mekoniu u novorozenců narozených vaginálním porodem nebo císařským řezem. V současné době se předpokládá, že mateřské mléko je hlavním postnatálním zdrojem bakterií ve střevě kojence, a proto hraje důležitou roli při kolonizaci mikrobioty během prvních měsíců života. Složení mateřského mléka se může pozoruhodně lišit u stejného jedince, na základě různých faktorů. Životní styl matky, stravovací návyky, nutriční a imunologický stav a doba laktace ovlivňují mikrobiotu mateřského mléka. Kromě toho byly v poslední době objeveny

specifické mikrobiální rozdíly spojené s indexem tělesné hmotnosti matky, přírůstkem hmotnosti a způsobem porodu. S touto souvislostí se zabývala studie Khodayar-Pardo et al. (2014), která vyhodnotila vliv specifických perinatálních faktorů, jako je fáze laktace, gestační věk a způsob porodu na mikrobiotu lidského mléka. Výsledkem této studie bylo zjištění významných rozdílů celkové koncentrace bakterií, zejména *Bifidobacterium* spp. mezi mlezivem, přechodným mlékem a zralým mlékem. Množství všech zkoumaných bakterií se zvyšovalo během období laktace. Celková koncentrace bakterií byla významně nižší v mlezivu než v přechodném a zralém mléce. Podobně tomu byl i obsah *Bifidobacterium* spp., který byl významně nižší v mlezivu i v přechodném mléce ve srovnání s mlékem zralým. Nadále tato studie našla významné rozdíly ve složení mikrobioty mléka mezi skupinou matek, které rodily v termínu (GAT) a skupinou matek, které rodily předčasně v různých fázích laktace. Počty *Bifidobacterium* spp. byly významně vyšší u GAT než u matek s předčasným porodem ve všech fázích laktace. Gestační věk tedy může také hrát významnou roli při rozvoji dětské mikrobioty.

Vysoká koncentrace bifidobakterií je důležitým znakem pro determinaci vývoje zdravé mikrobioty a jejich výskyt lze považovat za charakteristický znak u zdravých kojených dětí. Mateřské mléko má své specifické a charakteristické druhy bifidobakterií. U kojených dětí *Bifidobacterium* spp. může dosáhnout 60 až 90 % celkové fekální mikrobioty ve srovnání s kojenci krmenými umělou výživou. Ale i u kojených dětí jiné bifidobakteriální složení není neobvyklé. Přenos konkrétních bifidobakterií z matky na kojence naznačuje, že každý pár matka-kojenec může mít jedinečné bakterie specifické pouze pro jejich vztah (Khodayar-Pardo et al. 2014).

Předpokládalo se, že nitroděložní prostředí je sterilní. Rostoucí množství důkazů naznačuje opak. Během těhotenství dochází k přenosu bakterií z matky na plod. Zda je plodová voda kolonizována nebo ne, je velmi diskutabilní. Studie na zvířatech ukázaly, že je možný prenatální přenos mikrobů na plod a fyziologické změny pozorované u těhotných matek naznačují, že přenos *in utero* je pravděpodobný také u lidí. Uvádí se, že ke kolonizaci plodu u nekomplikovaných těhotenství dochází během prasknutí plodové vody a mikrobiální kolonizace potomků začíná po kontrakcích dělohy a přetrhnutí plodové membrány. Do té doby zdá se být prostředí plodu sterilní (Vandenplas et al. 2020).

Mikrobiální složení stolice kojenců také souvisí s tělesnou hmotností a přírůstkem hmotnosti matek během těhotenství (Collado et al. 2010). Byly prokázány významné účinky mateřské obezity na složení střevního mikrobiomu potomků. Kromě toho existují nedávné důkazy o příčinné roli obezity matek spojené s kojeneckou dysbiózou mikrobioty a dětské obezity (Galley et al. 2014).

Navzdory vysoké variabilitě mezi výsledky studií o existenci endogenního původu bakterií v mateřském mléce je suplementace probiotickými druhy bakterií sporná. Je třeba určit, zda existence mikrobioty v mateřském mléce má přímou souvislost s přenosem na potomka a jeho následným ovlivněním bakteriálního vývoje po narození.

Existuje široká škála faktorů ovlivňující kolonizaci matky a potomka jako je prenatální stres matky, stres v raném stádiu života jedince, způsob porodu, antibiotická léčba, tělesná hmotnost a další. Je třeba odpovědět na mnoho otázek týkajících se vlivu těchto faktorů, než bude možné implementovat poznatky o mléčné mikrobiotě ve strategiích k řešení zdravotních problémů matek a kojenců nebo v péči o dojnice.

7 Závěr

Tato diplomová práce si dala za cíl ověřit, zda může být mléko matky zdrojem bifidobakterií pro kolonizaci trávicího traktu. Zjištění diplomové práce bylo, že pokud byly bifidobakterie podávány krávám před otelením, významně to neovlivnilo mikrobiotu telete a bifidobakterie se ve větší míře nedostaly do mléka matek. Tudíž mléko nemohlo být významným zdrojem podaného kmene bifidobakterií. Z výsledků bylo zjištěno, že počty stanovených bakterií byly značně individuální a pokud byly bifidobakterie schopné přežít v trávicím traktu matky, tak se objevily i v odebraných vzorcích. Tudíž pokud přežily bifidobakterie u matky, objevily se i u mláďete. Zdrojem kolonizace mláďat byl však pravděpodobněji trávicí trakt matky než její mléko. Větší váhu lze přisuzovat psychickému faktoru. Telata, která po porodu zůstala s matkou, měla pozorovatelně zvýšený počet bifidobakterií oproti telatům, která byla ihned po porodu odebrána matce.

8 Literatura

- Adlerberth I, Wold AE. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* **98**:229–238.
- AFRC RF. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**:365–378.
- Agrawal R. 2005. Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology* **19**:227–246.
- Akagawa S et al. 2019. Effect of delivery mode and nutrition on gut microbiota in Neonates. *Annals of Nutrition and Metabolism* **74**:132–139.
- Amini-Khoei H et al. 2019. On the role of corticosterone in behavioral disorders, microbiota composition alteration and neuroimmune response in adult male mice subjected to maternal separation stress. *International Immunopharmacology* **66**:242–250.
- Apajalahti J. 2005. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. *Journal of Applied Poultry Research* **14**:444–453.
- Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: Antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases* **50**:1551–1558.
- Arumugam M et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180.
- Bäckhed F et al. 2015. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe* **17**:690–703.
- Baquero F, Nombela C. 2012. The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:2–4.
- Beneš J. 2018. Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití. Grada Publishing, Praha.
- Bennet R, Eriksson M, Nord CE. 2002. The fecal microflora of 1-3-month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. *Infection* **30**:158–160.
- Bergey DH, Buchanan RE, Gibbons NE, Microbiology. AS for. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. 2011. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* **17**:478–482. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.009>.
- Biagi E et al. 2010. Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS ONE* **5**.
- Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* **86**:13–15. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>.

- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* **50**:117–131.
- Bokulich NA et al. 2016. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science Translational Medicine* **8**:1–14.
- Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM. 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* **50**:2374–2383.
- Chassard C, Lacroix C. 2013. Carbohydrates and the human gut microbiota. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **16**:453–460.
- Chen H, Tan D. 2019. Cesarean section or natural childbirth? Cesarean birth may damage your health. *Frontiers in Psychology* **10**:1–7.
- Claesson MJ et al. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:4586–4591.
- Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. 2010. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: A prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *American Journal of Clinical Nutrition* **92**:1023–1030.
- Collier-Hyams LS, Neish AS. 2005. Innate immune relationship between commensal flora and the mammalian intestinal epithelium. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**:1339–1348.
- Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. 2012. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* **336**:1255–1262.
- Cox LM et al. 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* **158**:705–721.
- Cronin M, Ventura M, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**:4–18.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* **70**:443–459.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:14691–14696.
- Deehan EC, Duar RM, Armet AM, Perez-muñoz ME, Jin M, Walter J. 2017. Modulation of

- the Gastrointestinal Microbiome with Nondigestible Fermentable Carbohydrates To Improve Human Health. *Bugs as Drugs*:453–483.
- Degruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. 2016. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflammatory Bowel Diseases* **22**:1137–1150.
- Del Chierico F et al. 2015. Phylogenetic and metabolic tracking of gut microbiota during perinatal development. *PLoS ONE* **10**:1–26.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:11971–11975.
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:119–125.
- Doré J, Corthier G. 2010. Le microbiote intestinal humain. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* **34**:S7–S15. Elsevier. Dostupné z [http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70015-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70015-4).
- Dudek-Wicher RK, Junka A, Bartoszewicz M. 2018. The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Przegląd Gastroenterologiczny* **13**:85–92.
- Elphick HL, Elphick DA, Sanders DS. 2006. Small bowel bacterial overgrowth. An underrecognized cause of malnutrition in older adults. *Geriatrics* **61**:21–26. United States.
- Faith JJ et al. 2013. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* **341**.
- Fallani M et al. 2010. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: Geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **51**:77–84.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. 2003. Intestinal microflora in early infancy. *Acta Paediatrica* **91**:48–55.
- Fung I, Garrett JPD, Shahane A, Kwan M. 2012. Do bugs control our fate? the influence of the microbiome on autoimmunity. *Current Allergy and Asthma Reports* **12**:511–519.
- Galley JD, Bailey M, Dush CK, Schoppe-Sullivan S, Christian LM. 2014. Maternal obesity is associated with alterations in the gut microbiome in toddlers. *PLoS ONE* **9**.
- Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Malagelada JR. 2001. Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut* **48**:503–507.
- Gavini F, Van Esbroeck M, Touzel JP, Fourment A, Goossens H. 1996. Detection of

- Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the Bifid-shunt, in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe* **2**:191–193.
- Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. 1999. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* **80**.
- Gibson GR. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *Journal of Nutrition* **129**:1438–1441.
- Gibson GR et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **14**:491–502. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* **125**:1401–1412.
- Gomes AMP, Malcata FX. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology* **10**:139–157.
- Gupta S, Allen-Vercoe E, Petrof EO. 2016. Fecal microbiota transplantation: In perspective. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* **9**:229–239.
- Gupta V, Garg R. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology* **27**:202–209.
- Hamer HM, de Preter V, Windey K, Verbeke K. 2012. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: Relevant to health? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **302**.
- Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G, Plagemann A. 2005. Duration of breastfeeding and risk of overweight: A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* **162**:397–403.
- Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW. 2000a. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4523–4527.
- Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. 2000b. 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**. Dostupné z https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2000/01000/Analysis_of_Intestinal_Flora_Development_in.19.aspx.
- He T, Harmsen HJM, Raangs GC, Welling GW. 2003. Composition of Faecal Microbiota of Elderly People. *Microbial Ecology in Health and Disease* **15**:153–159.
- Hill C et al. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for

- probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **11**:506–514. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
- Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. 2017. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and Environments* **32**:300–313.
- Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* **48**:198–205.
- Hrabák J, Chudácková E, Walková R. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clinical microbiology reviews* **26**:103–114. American Society for Microbiology. Dostupné z <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23297261>.
- Huong TT, Kopel P, Komínková M, Guráň R, Ruttkay-Nedecký B, Trnková L, Zítka O, Adam V, Kizek R. 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **1**:64–66.
- Hussey S, Wall R, Gruffman E, O’Sullivan L, Ryan CA, Murphy B, Fitzgerald G, Stanton C, Ross RP. 2011. Parenteral antibiotics reduce bifidobacteria colonization and diversity in neonates. *International Journal of Microbiology* **2011**.
- Iqbal J, Hussain MM. 2009. Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **296**.
- Irvine EJ, Marshall JK. 2000. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn’s disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* **119**:1740–1744. Dostupné z <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508500700205>.
- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Björkstén B, Engstrand L, Andersson AF. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* **63**:559–566.
- Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nuño-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology* **51**:270–274.
- Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C. 2014. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of Perinatology* **34**:599–605.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Koppová I, Havlík J, Benada O, Kott T. 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:1315–1321.

- Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, Huttenhower C, Ley RE. 2013. A Guide to Enterotypes across the Human Body: Meta-Analysis of Microbial Community Structures in Human Microbiome Datasets. *PLoS Computational Biology* **9**.
- Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, Gautam SK, Singh B. 2013. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutrition Reviews* **71**:23–34.
- Laurin D, Brodeur JM, Bourdages J, Vallée R, Lachapelle D. 1994. Fibre intake in elderly individuals with poor masticatory performance. *Journal (Canadian Dental Association)* **60**:443-446,449. Canada.
- Lawley TD, Walker AW. 2013. Intestinal colonization resistance. *Immunology* **138**:1–11.
- Lee SA, Lim JY, Kim BS, Cho SJ, Kim NY, Kim O Bin, Kim Y. 2015. Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing. *Nutrition Research and Practice* **9**:242–248.
- LEE Y-K. 2013. Effects of Diet on Gut Microbiota Profile and the Implications for Health and Disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* **32**:1–12.
- Leszczyszyn JJ, Radomski M, Leszczyszyn AM. 2016. Intestinal microbiota transplant - Current state of knowledge. *Reumatologia* **54**:24–28.
- Liang C et al. 2017. Diversity and enterotype in gut bacterial community of adults in Taiwan. *BMC Genomics* **18**:932. Dostępne z <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3261-6>.
- Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**:747–748. American Association for the Advancement of Science.
- Lim MY, Rho M, Song YM, Lee K, Sung J, Ko G. 2014. Stability of gut enterotypes in Korean monozygotic twins and their association with biomarkers and diet. *Scientific Reports* **4**:1–7.
- Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. 1986. Protein degradation by human intestinal bacteria. *Journal of General Microbiology* **132**:1647–1656.
- Macfarlane GT, Macfarlane S. 1997. Human colonic microbiota: Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement* **32**:3–9.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* **69**.
- Mackowiak PA. 2013. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health* **1**:1–3.
- Maier L, Typas A. 2017. Systematically investigating the impact of medication on the gut

- microbiome. *Current Opinion in Microbiology* **39**:128–135. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.001>.
- Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. 2018. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host and Microbe* **23**:705–715.
- Manning TS, Gibson GR. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. Best practice & research. *Clinical gastroenterology* **18**:287–298. Netherlands.
- Marcobal A, Sonnenburg JL. 2012. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* **18**:12–15.
- Markowiak P, Ślizewska K. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* **9**.
- Martin R et al. 2016. Early-Life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PLoS ONE* **11**:1–30.
- Mathys S, Lacroix C, Mini R, Meile L. 2008. PCR and real-time PCR primers developed for detection and identification of *Bifidobacterium thermophilum* in faeces. *BMC Microbiology* **8**:1–8.
- Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology* **93**:109–113.
- Mcfarland L V. 1998. Epidemiology, Risk Factors and Treatments for Antibiotic-Associated Diarrhea Antibiotic complications Antibiotic-associated diarrhea *Clostridium difficile* *Epidemiology Diarrhea, risk factors* **98102**:292–307. Dostupné z <http://www.karger.com>.
- Metchnikoff E, Mitchell PC. 1910. The prolongation of life; optimistic studies. G.P. Putnam's Sons, New York & London.
- Mitall BK, Garg SK. 1995. Anticarcinogenic, Hypocholesterolemic, and Antagonistic Activities of *Lactobacillus acidophilus*. *Critical Reviews in Microbiology* **21**:175–214. Taylor & Francis. Dostupné z <https://doi.org/10.3109/10408419509113540>.
- Molina-Torres G, Rodriguez-Arrastia M, Roman P, Sanchez-Labraca N, Cardona D. 2019. Stress and the gut microbiota-brain axis. *Behavioural Pharmacology* **30**:187–200.
- Monreal M. 2005. Intestinal microbiota in patients with bacterial infections of the respiratory tract treated with amoxicillin. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **11**.
- Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. 2015. The infant microbiome development: Mom matters. *Trends in Molecular Medicine* **21**:109–117. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.002>.
- Musilova S, Rada V, Vlkova E, Bunesova V, Nevoral J. 2015. Colonisation of the gut by

- bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* **104**:e184–e186.
- Myhrstad MCW, Tunsjø H, Charnock C, Telle-Hansen VH. 2020. Dietary Fiber, Gut Microbiota, and Metabolic Regulation-Current Status in Human Randomized Trials. *Nutrients* **12**:859. MDPI. Dostupné z <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32210176>.
- Nakayama J, Yamamoto A, Palermo-Conde LA, Higashi K, Sonomoto K, Tan J, Lee YK. 2017. Impact of westernized diet on gut microbiota in children on Leyte island. *Frontiers in Microbiology* **8**:1–18.
- O’Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- 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**:1–9.
- Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Osawa R. 2016. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiology* **16**:1–12. *BMC Microbiology*. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0708-5>.
- Oh KJ, Lee SE, Jung H, Kim G, Romero R, Yoon BH. 2010. Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency. *Journal of Perinatal Medicine* **38**:261–268.
- Ojetti V, Gigante G, Ainora ME, Fiore F, Barbaro F, Gasbarrini A. 2009. Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Digestive and Liver Disease Supplements* **3**:35–39. Editrice Gastroenterologica Italiana S.r.l. Dostupné z [http://dx.doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60017-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60017-6).
- Orla-Jensen S. 1924. La classification des bactéries lactiques.
- Payne AN, Chassard C, Lacroix C. 2012. Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: Implications for host-microbe interactions contributing to obesity. *Obesity Reviews* **13**:799–809.
- Pédron T, Sansonetti P. 2008. Commensals, Bacterial Pathogens and Intestinal Inflammation: An Intriguing Ménage à Trois. *Cell Host and Microbe* **3**:344–347.
- 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**:511–521.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition* **6**:285–306.
- Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, Tims S, Zoetendal EG, De Vos WM. 2013. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental*

- Microbiology **15**:1146–1159.
- Reid G, Younes JA, Van Der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. 2011. Microbiota restoration: Natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology* **9**:27–38. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2473>.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernández-García M, De Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. 2008. Mucin degradation by Bifidobacterium strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:1936–1940.
- Salminen S, Bouley C, Boutron M-C, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau M-C, Roberfroid M, Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* **80**:S147–S171.
- Salminen S, Isolauri E. 2006. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *Journal of Pediatrics* **149**:115–120.
- Scardovi V, Trovatelli LD. 1974. Bifidobacterium animalis (Mitsuoka) comb. nov. and the “minimum” and “subtile” Groups of New Bifidobacteria Found in Sewage **24**:21–28.
- Scott K, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research* **69**:52–60. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>.
- Scott KP, Duncan SH, Flint HJ. 2008. Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin* **33**:201–211.
- Shao Y et al. 2019. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature* **574**:117–121. Springer US. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1560-1>.
- Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD, Singh A. 2014. Selection criteria for probiotics: A review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* **9**:17–22.
- Simpson MR, Avershina E, Storrø O, Johnsen R, Rudi K, Øien T. 2018. Breastfeeding-associated microbiota in human milk following supplementation with Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus acidophilus La-5, and Bifidobacterium animalis ssp. lactis Bb-12. *Journal of Dairy Science* **101**:889–899. American Dairy Science Association. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13411>.
- Simpson PJ, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2004. Bifidobacterium psychraerophilum sp. nov. and Aeriscardovia aeriphila gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:401–406.
- Solano-Aguilar G, Shea-Donohue T, Madden KB, Quinoñes A, Beshah E, Lakshman S, Xie Y, Dawson H, Urban JF. 2018. Bifidobacterium animalis subspecies lactis modulates the local immune response and glucose uptake in the small intestine of juvenile pigs infected with the parasitic nematode Ascaris suum. *Gut Microbes* **9**:422–436. Taylor & Francis. Dostupné z <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1460014>.

- Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P, Reynolds PR, Feldman RG, Sullivan MHF. 2005. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatric Research* **57**:404–411.
- Stewart CJ et al. 2018. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* **562**:583–588.
- Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, Roehl KA, Nelson DM, MacOnes GA, Mysorekar IU. 2013. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **208**:226.e1-226.e7. Elsevier Inc. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2013.01.018>.
- Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. 2010. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews* **9**:107–116. Elsevier B.V. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.004>.
- Tissier H. 1900. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons : état normal et pathologique. G. Carré et C. Naud, Paris.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* **449**:804–810.
- Turroni F, van Sinderen D, Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* **149**:37–44.
- Uhr GT, Dohnalová L, Thaiss CA. 2019. The Dimension of Time in Host-Microbiome Interactions. *mSystems* **4**:1–7.
- van Vleck Pereira R, Lima S, Siler JD, Foditsch C, Warnick LD, Bicalho RC. 2016. Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: Longitudinal effect on fecal microbiota composition in preweaned calves. *PLoS ONE* **11**:1–18.
- Vandenplas Y, Carnielli VP, Ksiazek J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, Picaud JC, Possner M, Singhal A, Wabitsch M. 2020. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition* **78**:1–7. Elsevier Inc.
- Vimala Y, Kumar PD. 2006. Some aspects of probiotics. *Indian Journal of Microbiology* **46**:1–7.
- Vlková E, Medková J, Rada V. 2002. Comparison of four methods for identification of bifidobacteria to the genus level. *Czech Journal of Food Sciences* **20**:171–174.
- Vlková E, Salmonová H, Bunešová V, Geigerová M, Rada V, Musilová Š. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* **34**:27–33. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.001>.
- Weersma RK, Zhernakova A, Fu J. 2020. Interaction between drugs and the gut microbiome.

- Gut **69**:1510–1519.
- Williams NT. 2010. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* **67**:449–458.
- Wu GD et al. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **334**:105–108.
- Yoon JH, Lee ST, Park YH. 1998. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:187–194.
- Zapata HJ, Quagliarello VJ. 2015. The microbiota and microbiome in aging: Potential implications in health and age-related diseases. *Journal of the American Geriatrics Society* **63**:776–781.
- Ze X, Duncan SH, Louis P, Flint HJ. 2012. *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME Journal* **6**:1535–1543. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.4>.
- Zhang J et al. 2014. Mongolians core gut microbiota and its correlation with seasonal dietary changes. *Scientific Reports* **4**:1–11.
- Zijlmans MAC, Korpela K, Riksen-Walraven JM, de Vos WM, de Weerth C. 2015. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology* **53**:233–245. Elsevier Ltd. Dostupné z <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.006>.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

BIF	bifidobakterie kultivované na agaru B
CFU	colony forming unit
CP	celkové počty anaerobních bakterií
EC – B	koliformní bakterie
EC – M	<i>E. coli</i>
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
F6PPK	fruktóza-6-fosfátfosfoketoláza
GAT	matky, které rodily v termínu
GIT	gastrointestinální trakt
HPA osa	hypofýza-nadledvinová osu
ISAPP	Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika
KTJ	kolonii tvořící jednotky
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
LB	laktobacily
MALDI–TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight; laserová desorpce a ionizace za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MJ	monomerní jednotky
MS	hmotnostní spektrometrie
NOR	bifidobakterie kultivované na agaru N
RRBIF	rifampicin rezistentní bifidobakterie
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
TT	trávicí trakt

10 Samostatné přílohy

Příloha č. 1 – Příprava na pipetování do Petriho misek (Foto autor textu)

