

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Zoologie



Bc. Aneta Ptáčnicková

Bakteriální populace ve sliznicích myši domácí
Bacterial populations in mucosal tissues of the house mouse

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Romana Stopková, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 1. 2019

.....
Aneta Ptáčnicková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Pavlu Stopkovi a své konzultantce Romaně Stopkové za odborné vedení diplomové práce, cenné rady a trpělivost. Také děkuji Jakubu Kreisingerovi a Lucii Schmiedové za pomoc při přípravě a vyhodnocení týkající se sekvenční části této práce.

Abstrakt

Mikrobiota se v posledních letech stává důležitým předmětem biologického výzkumu. Ukazuje se, že významně ovlivňuje široké spektrum funkcí různých organismů. Tato diplomová práce se zabývá bakteriální složkou mikrobioty nacházející se ve vybraných sliznicích u samců a samic divoké populace myši domácí (*Mus musculus musculus*). Zkoumané vzorky obsahovaly výplachy z nosní sliznice, ústní dutiny, moč, výplachy vaginální sliznice a trus. Cílem této práce bylo detekovat kvantitativní a kvalitativní změny bakteriálních populací mezi sliznicemi a taktéž mezi fázemi estrálního cyklu ve vaginální sliznici. Další cíl byl zaměřen na detekci pohlavních rozdílů týkající se bakterií v jednotlivých sliznicích. S využitím qPCR byla odhadnuta bakteriální abundance a následnou sekvenací variabilní oblasti genu pro 16S rRNA byla detekována bakteriální diverzita sliznic. Výsledky prokázaly, že sliznice se odlišují v odhadovaném množství bakterií a také hodnotami alfa diverzity. Zatímco trus byl místem s největším počtem bakterií, nosní sliznice a moč obsahovaly bakterií nejméně. Taktéž nejvyšší alfa diverzita byla detekována ve vzorcích trusu, naopak nejnižší hodnotu alfa diverzity měly vzorky moči. Dále bylo prokázáno, že každá sliznice je specifická svým bakteriálním složením, dokonce i na rodové úrovni. Signifikantní výsledky byly prokázány i ve změnách bakteriálních populací ve vagině v průběhu estrálního cyklu. V estru byl oproti následujícím fázím detekován nárůst v počtu bakterií, zejména u rodu *Rodentibacter*. V této fázi byla zároveň naměřena nejnižší alfa diverzita. Vliv pohlaví na bakteriální populace nebyl signifikantně prokázán v žádné sliznici.

Klíčová slova: myš, *Mus*, mikrobiota, estrální cyklus, qPCR, sekvenace DNA

Abstract

Microbiota becomes one of the most important subjects in biological research and numerous studies revealed that microbiota plays a broad spectrum of essential roles in different organisms. This master thesis focuses on the bacterial part of microbiota contained in mucosal tissues of wild house mice (*Mus musculus musculus*). Male and female samples were collected by nasal and oral cavity lavages, vaginal mucosa lavages and from urine and stool. We aimed to detect quantitative, qualitative and sex-specific differences in bacterial populations between mucosal tissues with particular focus on bacterial cycling in vaginal mucosa during the estrous cycles. Bacterial abundances were estimated by qPCR whilst bacterial diversity was detected by targeted metagenomic sequencing of the hypervariable region of the 16S rRNA gene. Significant differences were detected in bacterial abundances and alpha diversity between particular mucosal tissues. Stool samples contained the highest number of bacteria, while samples from the nasal mucosa and urine contained low amount of bacteria. The highest alpha diversity was discovered in stool samples, the least alpha diversity was found in the urine. Mucosal tissues also varied based on the bacterial composition on the level of particular genera. Detailed analysis of estrous cycles revealed significant changes in microbiota. High bacterial load and low alpha diversity was detected during proestrus and estrus – represented e.g. by the genus *Rodentibacter* – whilst the load rapidly decreased in metestrus and diestrus. However, no other sex-specific differences between particular tissues were detected in this study.

Keywords: mice, *Mus*, microbiota, estrous cycle, qPCR, sequencing DNA

Seznam použitých zkratk

OTU	operační taxonomická jednotka/ky (z angl. operational taxonomic unit)
GF myši	axenické myši (z angl. germ-free mice)
SPF myši	myši bez specifických patogenů (z angl. specific-pathogen-free mice)
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z angl. fatty chain acid)
HPA osa	osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (z angl. hypothalamic-pituitary- adrenal axis)
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (z angl. brain derived neurotrophic factor)
VBNC bakterie	životaschopné nekultivovatelné bakterie (z angl. viable but nonculturable bacteria)
CAMP	z angl. cathelicidin antimicrobial peptide
NGP	z angl. neurotropic granule protein
OBP	odorant vázající protein (z angl. odorant binding protein)
AMP	antimikrobiální proteiny
MUP	hlavní močový protein (z angl. major urinary protein)
LPN	lipokalin (z angl. lipocalin)
Cp	z angl. crossing point
NMDS	nemetrické mnohorozměrné škálování (z angl. non-metric multidimensional scaling)

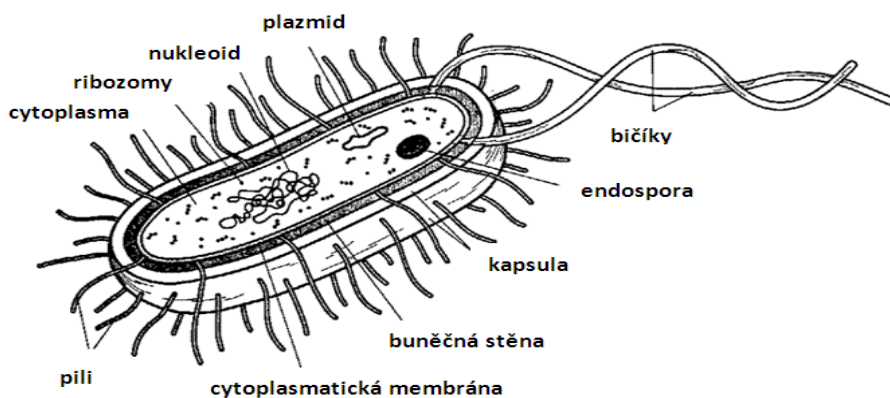
OBSAH

1 Úvod	1
1.1 Střevní mikrobiota	5
1.2 Mikrobiota v moči	8
1.3 Vaginální mikrobiota	10
1.4 Mikrobiota oka	12
1.5 Mikrobiota nosní sliznice	13
1.6 Mikrobiota ústní dutiny	14
1.7 Pohlavně specifické složení mikrobioty	17
1.7 Chemická komunikace	19
1.8 Cíle diplomové práce	21
2 Metodika	23
2.1 Myš domácí	23
2.2 Odběr vzorků	23
2.3 Určení fáze estrálního cyklu	24
2.5 Izolace DNA	26
2.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	27
2.7 Příprava sekvenační knihovny	29
2.8 Bioinformatické analýzy	31
2.8 Statistické analýzy	32
3 Výsledky	34
3.1 Kvantifikace bakterií ve sliznicích myši domácí	34
3.2 Bakteriální diverzita ve sliznicích myši domácí	37
3.2.1 Statistické zhodnocení bakteriální alfa diverzity	37
3.2.2 Detailní zastoupení jednotlivých bakteriálních taxonů	39
3.2.3 Porovnání mikrobiálního složení mezi sliznicemi	45
3.3 Kvantitativní a kvalitativní změny mikrobioty ve vagině v průběhu estrálního cyklu myši domácí	48
3.4 Vliv pohlaví na mikrobiotu	54
4 Diskuze	55
6 Závěr	61
7 Reference	63

1 Úvod

Bakterie tvoří jednu ze tří základních domén života, dalšími jsou Archea a Eukaryota (Woese et al., 1990). Nejstarší fosilie bakterií jsou datovány do období prahor z doby před 3,5 miliardami let a pochází z nalezišť v severozápadní Austrálii a jižní Africe (Awramik et al., 1983; Walsh a Lowe, 1985). Bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické mikroorganismy obývající nejrůznější prostředí po celé Zemi. Jejich velikost se obvykle pohybuje v řádu několika mikrometrů a většina bakterií má kulovitý nebo tyčinkovitý tvar (Madigan et al., 2010).

Bakteriální buňka má charakteristické strukturní znaky prokaryot. Namísto pravého jádra ohraničeného jadernou membránou, které se vyskytuje u eukaryotických buněk, obsahuje pouze nukleoid. Ten je umístěn v cytoplasmě a je tvořen jedinou cirkulární molekulou DNA. Dalším znakem je absence jakýchkoliv membránových organel v cytoplasmě, jako jsou například mitochondrie, endoplasmatické retikulum či Golgiho aparát, které jsou běžně přítomné u eukaryotických buněk. Jedinou membránovou organelu tak představuje pouze cytoplasmatická membrána. Bakterie dále obsahují ribozomy, které se podílí na syntéze proteinů a svojí stavbou se odlišují od ribozomů eukaryot. Ribozom prokaryot se skládá z malé podjednotky obsahující proteiny, které jsou kódovány 16S rRNA a velké podjednotky obsahující proteiny kódovány 5S a 23S rRNA. Většina bakterií má okolo cytoplasmatické membrány peptidoglykanovou buněčnou stěnu, která buňce dodává tvar a mechanickou odolnost vůči vnějšímu prostředí. Některé bakterie mají navíc na povrchu buněčné stěny kapsulu, která také přispívá k ochraně celé buňky. Na buňce mohou být dále přítomny bičíky či pili umožňující pohyb. Bakterie mohou obsahovat také útvary zvané plazmidy, které jsou stejně jako nukleoid nositeli genetické informace (Madigan et al., 2010; Vellai a Vida, 1999) (Obr. č. 1).



Obr. č. 1: Struktura bakteriální buňky. Upraveno z Hiremath et al. (2012)

Bakterie lze rozlišit dle rozdílné stavby buněčné stěny na tzv. gram negativní a gram pozitivní. Na základě propustnosti buněčné stěny získávají bakterie při použití Gramovy barvicí metody odlišné zbarvení. U grampozitivních bakterií je buněčná stěna tvořena silnou peptidoglykanovou vrstvou. Krystalová violet', která se při tomto způsobu barvení používá, se dostane dovnitř buňky a dodá jí modrofialové zbarvení. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je komplexnější a skládá se z tenké peptidoglykanové vrstvy a vnější membrány, která obsahuje také vrstvu lipopolysacharidů. Kvůli vyšší propustnosti této buněčné stěny je v následném kroku krystalová violet' z buňky vymyta a po dobarvení karbolfuchsinem či safraninem jsou bakterie zbarveny růžově (Beveridge, 2001).

Bakterie jsou všudypřítomné - vyskytují se v půdě, ve vodě, ve vzduchu, ale také na povrchu a uvnitř těl rostlin a živočichů (např. Torsvik et al., 1990; Zhang et al., 1991; Rodrigue et al., 1993; Brodie et al., 2007; Wang et al., 2012). Mikroorganismy, které žijí v symbiotickém vztahu se svým hostitelem, se souhrnně označují jako mikrobiota. Tvoří ji viry, bakterie, archea, prvoci i houby. Taktéž se používá termín mikrobiom, do kterého se řadí mikrobiota, soubor všech jejích genomů a prostředí. Existuje také termín metagenom, který přímo definuje soubor genomů komunity mikroorganismů získaných z konkrétního prostředí (Marchesi a Ravel, 2015). Vzhledem k tomu, že tyto definice nejsou zatím plně ustálené a jsou často zaměňované, pro potřeby této diplomové práce bude používán pouze termín mikrobiota, ve kterém jsou zahrnuty jen bakterie bez ostatních mikroorganismů. Bakteriální diverzita se nejčastěji určuje pomocí sekvenace variabilního úseku 16S rRNA. Sekvence tohoto úseku jsou na základě podobnosti (většinou 97%) dále klastrovány do tzv. operačních taxonomických jednotek (OTU, z angl. operational taxonomic unit) (Nguyen et al., 2016).

Bakterie tvoří podstatnou složku celého organismu. Například počet bakteriálních buněk v lidském těle převyšuje počet vlastních buněk a jejich poměr byl dříve odhadován na 10:1. Současné odhady jsou střídmější a ukazuje se, že u muže vážícího 70 kg tvoří bakterie kolem $3,8 \times 10^{13}$ buněk, zatímco vlastních buněk je okolo $3,0 \times 10^{13}$. Váha všech bakteriálních buněk v lidském těle se pohybuje okolo 0,2 kg (Sender et al., 2016).

Vztah bakterií se svými hostiteli může mít podobu parazitismu, komensalismu nebo mutualismu. Parazitické bakterie svému hostiteli škodí a způsobují mu různá onemocnění, jako například *Helicobacter pylori* – původce zánětu žaludku (Dooley et al., 1989). Komezální bakterie svému hostiteli výrazně neprospívají, ale ani mu neškodí. Příkladem mohou být různé kožní bakterie, jako jsou některé kmeny *Propionibacterium*

acnes (Fitz-Gibbon et al., 2013). Přítomnost mutualistických bakterií má na hostitele pozitivní vliv. Podílí se na správném vývoji a funkci organismu a jakékoliv narušení takové bakteriální populace se může nepříznivě projevit na zdravotním stavu daného jedince (Gareau et al., 2011; Clemente et al., 2012). Patří k nim zejména různé střevní bakterie, které se podílí mimo jiné na zpracovávání potravy a syntéze důležitých látek (Gill et al., 2006). Střevní mikrobiota je někdy považována za samostatný orgán, což naznačuje její významnou funkci ve zdraví i nemoci (Bocci, 1992; Baquero a Nombela, 2012). Konkrétní druh bakterie však nemusí striktně náležet pouze k jednomu typu interakce vznikající mezi ním a hostitelem. Například bakterie *Escherichia coli* se skládá z mnoha různých kmenů, z nichž některé jsou neškodné či prospěšné a ostatní naopak pro svého hostitele představují patogeny (Clermont et al., 2011; Loong et al., 2016). Také doposud neškodné bakterie se v důsledku poklesu mutualistických bakterií mohou přemnožit a stát se patogenními mikroorganismy. Tato situace, kdy je narušena přirozená bakteriální rovnováha mezi mikrobiotou a hostitelem, se nazývá dysbióza. Často k ní dochází například ve vagině a označuje se termínem bakteriální vaginóza (Fredricks et al., 2005). O funkci převážně mutualistických bakterií v různých typech sliznic myši domácí budou pojednávat následující podkapitoly.

K porozumění symbiotických interakcí mezi bakteriemi a jejich hostiteli se využívají různé druhy modelových organismů. Ty umožňují objasnit, jakým způsobem vznikají různé typy těchto interakcí a jaké konkrétní procesy dokáže mikrobiota uvnitř hostitele ovlivňovat (Kostic et al., 2013). Jedním z modelových organismů je například havajská sépie - sepiola kropenatá (*Euprymna scolopes*), která žije v mutualistickém vztahu s bakteriemi druhu *Vibrio fischeri*. Tyto bakterie kolonizují ventrální stranu těla sepiol, kde se dostávají do světelného orgánu a následně spouští jeho maturaci. Bakterie produkují světelné záření, které sepioly během noci, kdy loví potravu, chrání před predátory vyskytujícími se pod nimi. Díky osvětlení jsou sepioly hůře detekovatelné, protože obrys jejich těla vizuálně splývá s vodní hladinou (tzv. protiosvětlení, z angl. counter-illumination). Pro bakterie je tento vztah také výhodný, protože zde získávají dostatek potřebných živin (Boettcher a Ruby, 1990; McFall-Ngai a Montgomery, 1990). Sepioly jsou vhodným modelovým organismem, protože umožňují zkoumat interakci mezi hostitelem a jen jedním jeho symbiontem (Kostic et al., 2013).

Dalším častým modelovým organismem je octomilka obecná (*Drosophilla melanogaster*). U tohoto živočicha bylo prokázáno široké spektrum působení mikrobioty na různé procesy, jako je například vývoj larvy (Storelli et al., 2011), utváření imunitního

systemu (Hedengren-Olcott et al., 2004) a také preference pro sexuálního partnera (Sharon et al., 2010). Octomilky byly rozděleny na dvě skupiny, které se lišily typem přijímané potravy. Poté byly obě tyto skupiny spojeny dohromady a ukázalo se, že octomilky dávají přednost páření s těmi jedinci, kteří dostávali stejný typ potravy. Pokud byla octomilkám podávána antibiotika, tato preference byla přerušena. Přijímaná potrava tedy následně modifikuje složení mikrobioty uvnitř střeva. Přesný mechanismus, jakým bakterie ovlivňují sexuální preference, není znám, ale zřejmě v něm mají roli různé odoranty, které mikrobiota svou činností produkuje (Sharon et al., 2010).

Mezi hojně využívané zástupce modelových organismů u obratlovců patří myš domácí (*Mus musculus*). Dosud existuje jen několik málo publikací, které se zabývají mikrobiotou u divokých myší. Vědecké výzkumy se soustředí spíše na detekci a vliv mikrobioty u laboratorních myší, jako jsou například kmeny BALB/c či C57BL/6 (Cowley a Heiss, 1991; Kaushic et al., 1998; Noguchi et al., 2003; Anderson et al., 2004). Takoví živočichové však mohou mít kvůli životu ve specifických laboratorních podmínkách pozměněnou skladbu i redukovanou diverzitu celé mikrobioty oproti populaci divokých jedinců (Weldon et al., 2015). Často se také využívají axenické myši (GF myši, z angl. germ-free mice), které jsou chovány ve sterilním prostředí, kde je zachován jejich bezmikrobní stav. Porovnání GF myší s kontrolními skupinami, jako jsou myši s běžnou mikrobiotou či myši, jejichž mikrobiota neobsahuje určité patogeny (SPF myši, z angl. specific-pathogen-free mice) pomáhá odhalit, v jakých oblastech a do jaké míry ovlivňují bakterie vývoj a fungování svého hostitele (Turnbaugh et al., 2006; Ivanov et al., 2008; Desbonnet et al., 2014).

1.1 Střevní mikrobiota

U myši je nejvíce prozkoumána stavba a funkce střevní mikrobioty. Střevní bakterie pomáhají rozkládat a dále zpracovávat, u myši a ostatních živočichů, jinak nestravitelné složky potravy (Hawksworth et al., 1971; Salyers et al., 1978). Jejich činností tak vznikají látky jako například mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA, z angl. short - chain fatty acid), které představují důležitý zdroj energie pro střevní buňky (Roediger, 1982; Donohoe et al., 2011), podporují jejich proliferaci (Sakata, 1987) a regulují imunitní odpověď ve střevě (Kim et al., 2013; Smith et al., 2013). Bakterie se také podílí na syntéze některých vitaminů (Burkholder a McVeigh, 1942; Leviton a Hargrove, 1952) či aminokyselin a ovlivňují metabolismus sacharidů (Gill et al., 2006).

Střevní mikrobiota má vliv i na ukládání tělesného tuku. Kontrolní myši měly oproti GF myším o 42 % více tělesného tuku navzdory tomu, že denně zkonsumovaly méně potravy. Po kolonizaci střeva bakteriemi u GF myši došlo k navýšení tělesného tuku téměř o 60 % i přesto, že byl u nich také zaznamenán nižší příjem potravy (Bäckhed et al., 2004). V posledních letech se ukazuje, že střevní bakterie by mohly přispívat i ke vzniku obezity. Mezi geneticky upravenými obézními a hubenými myšmi byly objeveny rozdíly ve skladbě této mikrobioty. Je tedy možné, že střevní bakterie obézních jedinců dokáží efektivněji zpracovávat živiny přijaté v potravě (Ley et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006, 2009). K tomu přispívá i fakt, že kolonizace GF myši mikrobiotou pocházejících z obézních jedinců způsobí vyšší přírůstek tělesného tuku, než kolonizace GF myši mikrobiotou od hubených jedinců (Turnbaugh et al., 2006).

Střevní bakterie jsou také důležité pro správný vývoj a funkci imunitního systému. Podílí se například na diferenciaci imunitních buněk, jako jsou některé pomocné (Mazmanian et al., 2005; Ivanov et al., 2008, 2009) a regulační T-lymfocyty (Round a Mazmanian, 2010) a podporují tvorbu lymfoidních tkání (Mazmanian et al., 2005). Bakterie také chrání střevo hostitele před kolonizací patogenními mikroorganismy (Van der Waaij et al., 1971; Theriot et al., 2014).

Působení střevní mikrobioty dosahuje až k mozku, kde výrazně ovlivňuje jeho vývoj a následně i širokou škálu chování a schopností daného jedince. Tento vztah je označován poměrně nově vzniklým termínem: osa mikrobiota - střevo - mozek (z angl. microbiota - gut - - brain axis) (Rhee et al., 2009; Bercik et al., 2011). Střevní bakterie mají prokazatelný vliv na rozvoj sociálního chování. V behaviorálních experimentech vykazovaly GF myši oproti kontrolním myším nestandardní znaky v sociálním chování

projevující se například menší sociální motivací, tedy nižší snahou o kontakt s jedinci stejného druhu (Desbonnet et al., 2014). Obdobné výsledky přinesly i experimenty s krysami (Degroote et al., 2016). GF myši a také myši, kterým byla podávána antibiotika pro narušení skladby střevní mikrobioty, měly oproti kontrolním myším také menší projevy úzkostného chování (Bercik et al., 2011; Heijtz et al., 2011; Neufeld et al., 2011; Arentsen et al., 2015; Desbonnet et al., 2015). To bylo posuzováno například pomocí testu světlého a tmavého boxu, který využívá nočního způsobu života myši a tedy i jejich přirozené tendence zdržovat se spíše v tmavších místech. Ve výzkumu Heijtz et al. (2011) se ukázalo, že GF myši strávily ve světlé části boxu signifikantně více času, než kontrolní myši a dokonce se v této části vyskytovaly častěji, než v tmavé.

Mezi další oblasti, které jsou ovlivňovány střevními bakteriemi, patří kognitivní schopnosti. U GF myši i myši s antibiotiky bylo zaznamenáno poškození v procesu dlouhodobé paměti (Gareau et al., 2011; Desbonnet et al., 2015; Fröhlich et al., 2016). Jiná série experimentů odhalila, že nepřítomnost mikrobioty nebo změna v jejím složení, může výrazně narušit také krátkodobou paměť (Gareau et al., 2011; Jang et al., 2018) a schopnost učení se (Bercik et al., 2011). U GF myši byly oproti kontrolní skupině myši zaznamenány také častější projevy repetitivního chování, například tzv. self-grooming neboli čištění vlastního těla (Desbonnet et al., 2014). Vliv bakterií byl prokázán i na pohybovou aktivitu. V Open-field testu urazily GF myši oproti kontrolním myším delší vzdálenost a také více prozkoumávaly své okolí (Heijtz et al., 2011; Arentsen et al., 2015).

Střevní mikrobiota působí i na funkci osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA osa, z angl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis), která spouští stresovou reakci organismu a jejíž činností je mimo jiné produkován i stresový hormon kortikosteron. U GF myši byla prokázána zvýšená reakce HPA osy. Po stresové zátěži jim byla naměřena vyšší hladina kortikosteronu v plasmě, než kontrolní skupině myši (Sudo et al., 2004; Gareau et al., 2011; Clarke et al., 2013).

Ukázalo se, že pokud byly GF myši kolonizovány bakteriemi, vyvíjely se běžným způsobem a v behaviorálních a dalších testech dosahovaly obdobných výsledků jako kontrolní myši. Oblasti, které byly působením bakterií napraveny, zahrnovaly sociální chování (Desbonnet et al., 2014), schopnost učení se, úzkostlivé chování (Bercik et al., 2011), pohybovou aktivitu (Heijtz et al., 2011) i reakci HPA osy (Sudo et al., 2004). Bylo však prokázáno, že kolonizace musí proběhnout v brzkém věku myši, protože existuje jen určité období života, kdy mohou bakterie ovlivňovat vývoj mozku a následně i chování.

Například činnost HPA osy mohla být pozměněna do šesti týdnů věku myši, později již neměly bakterie na vývoj HPA osy žádný účinek (Sudo et al., 2004).

Doposud nejsou zcela objasněny mechanismy, jakými bakterie působí na vývoj mozku svého hostitele. Bylo však prokázáno, že GF myši a myši, kterým byla podávána antibiotika, měly oproti kontrolním myším změny v expresi některých genů. Jedním z nich je například gen kódující mozkový neurotrofní faktor (z angl. brain derived neurotrophic factor = BDNF), jehož exprese byla v několika oblastech mozku, především v hippocampu nižší, než u kontrolní skupiny myši (Gareau et al., 2011; Heijtz et al., 2011; Clarke et al., 2013; Arentsen et al., 2015; Desbonnet et al., 2015). Protein BDNF se účastní neurogeneze a podílí se tak na vzniku nových neuronů a jejich dalším vývoji. Je proto důležitý i při procesech jako je učení a paměť (Linnarsson et al., 1997; Heldt et al., 2007). Některé vědecké publikace dávají do souvislosti nízkou expresi tohoto genu i s rozvojem úzkostného chování a depresi (Chen et al., 2006; Soliman et al., 2010; Berry et al., 2012). GF myši a myši s pozměněnou střevní mikrobiotou měly taktéž odlišnou hladinu některých neurotransmiterů oproti kontrolním myším. Rozdíly se týkaly především koncentrací serotoninu a jeho metabolitů v hippocampu a striatu, které byly zpravidla vyšší než u kontrolní skupiny myši a souvisely také s nižšími projevy úzkostného chování (Heijtz et al., 2011; Clarke et al., 2013; Desbonnet et al., 2015).

Dosavadní poznatky o střevní mikrobiotě divokých myši se zakládají především na analýze vzorků, které byly získány od poddruhu *Mus musculus domesticus*. Jeho střevní mikrobiota je tvořena zejména kmeny Firmicutes a Bacteroidetes. Poměry těchto dvou kmenů se mezi jedinci liší, ale většinou je dominantním kmenem Firmicutes. Mezi další přítomné bakteriální kmeny, avšak s výrazně nižší abundancí, patří například Proteobacteria, Deferribacteres, Tenericutes, Fusobacteria a TM7 (Linnenbrink et al., 2013; Kreisinger et al., 2014; Weldon et al., 2015). K nejhojnějším bakteriálním čeledím se řadí Lachnospiraceae a Ruminococcaceae (Weldon et al., 2015), k rodům dále *Bacteroides*, *Helicobacter*, *Robinsoniella* a *Barnesiella* (Linnenbrink et al., 2013; Wang et al., 2014). Složení této mikrobioty je utvářeno kombinacemi různých faktorů. Vliv má nejen genom hostitele (Benson et al., 2010; McKnite et al., 2012), ale i vnější prostředí jako je například dostupný typ potravy (Hildebrandt et al., 2009; Wang et al., 2014; Carmody et al., 2015).

Wang et al. (2014) se domnívají, že střevní mikrobiotu divokých myši lze podle zastoupení určitých bakteriálních rodů zařadit do jedné ze dvou skupin, tzv. enterotypů. První enterotyp (E1) byl definován zejména vyšší abundancí rodu *Bacteroides*, u druhého

enterotypu (E2) patřil k hojným rodům *Robinsoniella* a také neklasifikovaný rod z čeledi Lachnospiraceae. Enterotypy se odlišovaly poměrem přítomných funkčních genomických kategorií, které se podílí na zpracovávání potravy. E1 byl obohacen především o geny, které se účastní metabolismu proteinů, kdežto E2 naopak obsahoval více genů důležitých pro metabolismus sacharidů. Utváření enterotypů tedy pravděpodobně úzce souvisí s typem přijímané potravy (Wang et al., 2014). Tři různé enterotypy byly objeveny i v lidském střevě (Arumugam et al., 2011), avšak jejich existence je stále předmětem diskuzí (Knights et al., 2014; Clostea et al., 2018).

Divoké myši mají jiné složení střevní mikrobioty, než myši laboratorní. Kreisinger et al. (2014) objevili signifikantní rozdíl již na kmenové úrovni. Zatímco ve střevech divokých myší se vyskytovaly, jak již bylo zmíněno výše, převážně bakterie z kmene Firmicutes, u inbredních linií odvozených od divokých myší naopak dominoval kmen Bacteroidetes. Dále bylo prokázáno, že mezi těmito dvěma skupinami myší se 16 % OTU významně odlišuje. U divokých myší byly s větší abundancí detekovány bakterie z čeledí Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Ruminococaceae a Porphyromonadaceae. U inbredních myší byly naopak hojněji zastoupené bakterie z čeledí Rikenellaceae a Bacteroidaceae (Kreisinger et al., 2014). Linnenbrink et al. (2013) se zaměřili na porovnání počtu bakteriálních rodů a zjistili, že divoké myši mají v průměru více těchto rodů, než myši laboratorní. Nicméně v jiné publikaci dosahovala alfa i beta diverzita u obou skupin myší stejných hodnot (Kreisinger et al., 2014).

1.2 Mikrobiota v moči

Moč byla dříve chybně považována za sterilní tekutinu. S využitím metagenomického přístupu namísto běžných kultivačních metod se ukázalo, že ve skutečnosti se bakterie v moči běžně vyskytují a jejich přítomnost nemusí značit pouze nějaký druh močové infekce (Dong et al., 2011; Siddiqui et al., 2011; Wolfe et al., 2012; Lewis et al., 2013; Burton et al., 2017; Dietrich et al., 2017). Vědecký výzkum se zaměřuje především na člověka s cílem definovat jeho močový mikrobiom a odhalit, zda mají bakterie nějakou roli při vzniku onemocnění močového ústrojí (Pearce et al., 2014; Karstens et al., 2016; Curtiss et al., 2017). Mezi zdravými a nemocnými jedinci, trpícími například hyperaktivním močovým měchýřem, byly objeveny odchylky v kompozici této

mikrobioty. Ukazuje se tedy, že pro správnou funkci vylučovacího systému je skladba mikrobioty zřejmě velmi důležitým faktorem (Curtiss et al., 2017).

Mikrobiota v moči laboratorních a divokých myší nebyla doposud hlavním tématem žádného vědeckého výzkumu. Existuje pouze publikace, ve které byl výskyt bakterií v moči potvrzen u laboratorních myší BALB/c. Dále bylo odhaleno, že moč těchto myší obsahuje významný podíl složky životaschopných, ale nekultivovatelných bakterií (VBNC, z angl. viable but nonculturable bacteria). Tyto bakterie se nacházejí ve specifickém přechodném stavu, kdy se nedělí a tudíž nerostou v běžných kultivačních médiích jako ostatní bakterie. Nejsou tedy snadno detekovatelné a konečné výsledky o celkovém počtu živých bakterií v určitém vzorku mohou být silně podhodnoceny. Průměrná koncentrace kultivovatelných bakterií v moči BALB/c myší byla $1,5 \times 10^2$ CFU/ml, kdežto průměrná koncentrace VBNC bakterií dosahovala hodnoty $4,5 \times 10^6$ CFU/ml. Bližší popis ohledně skladby mikrobioty v moči myší však chybí (Anderson et al., 2004). Další publikace použily model myši pouze k bližšímu objasnění obrany organismu při infekci močových cest (Aronson et al., 1979; Hagberg et al., 1983; Hvidberg et al., 2000; Chromek et al., 2006).

Složení bakterií v moči nebylo detailně zkoumáno ani u jiných živočichů. Výjimku tvoří pouze pes domácí (Burton et al., 2017) a několik druhů afrických netopýrů (Dietrich et al., 2017). Nejhojnější OTU, které byly detekované ve všech dvaceti vzorcích moči psa s abundancí vyšší než 1 %, se řadí do kmene Proteobacteria. Mezi ně patří *Pseudomonas* sp., *Sphingobium* sp., *Acinetobacter johnsonii* a také blíže neklasifikované bakterie z čeledí Bradyrhizobiaceae a Xanthomonadaceae. Další OTU, s abundancí větší než 0,1 %, pochází zejména z kmene Proteobacteria, další z kmenů Bacteroidetes, Firmicutes a Actinobacteria. Dietrich et al. (2017) odebrali vzorky moči zástupcům čtyř druhů afrických netopýrů. Mezi nejhojněji zastoupené bakteriální kmeny, podobně jako u psů, patřily Firmicutes (39,3 % sekvencí), Proteobacteria (32,6 %) a Actinobacteria (13,1%). Mezi jednotlivými netopýry byla odhalena také velká variabilita ve složení této mikrobioty.

1.3 Vaginální mikrobiota

Skladba vaginální mikrobioty myši domácí byla doposud zkoumána pouze u laboratorních jedinců. Pomocí kultivačních metod bylo zjištěno, že k běžným bakteriálním rodům těchto myší patří *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* a *Actinomyces*. Jedná se tedy zejména o zástupce kmenů Firmicutes a Actinobacteria (Cowley a Heiss, 1991). Taktéž Noguchi et al. (2003) potvrdili pomocí kultivačních metod četný výskyt rodu *Streptococcus* ve vagině laboratorních myší. Ten se zde stal dokonce nejhojnějším rodem ve vagině vůbec. K nejvíce abundantním bakteriálním rodům, ve výzkumu založeném na sekvenování bakteriální DNA, se řadily kromě streptokoků také rody *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Enterococcus* a *Polaromonas*. Nejhojnější kmeny představovaly Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes a Cyanobacteria (Barfod et al., 2013).

Vaginální mikrobiota žen je naopak tvořena zejména bakteriemi rodu *Lactobacillus*. Převažují hlavně druhy jako *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* a *L. jensenii* (Zhou et al., 2004; Ravel et al., 2011; Gajer et al., 2012; Shipitsyna et al., 2013; Chaban et al., 2014). Laktobacily produkují kyselinu mléčnou, která výrazně přispívá k nižšímu vaginálnímu pH. Prostředí vaginy se tak stává pro spoustu patogenů nehostinné (Skarin a Sylwan, 1986; O'Hanlon et al., 2013). Dále syntetizují antimikrobiální peptidy - bakteriociny a také H₂O₂, které rovněž inhibují růst ostatních bakterií (Eschenbach et al., 1989; Klebanoff et al., 1991; Stoyancheva, et al., 2014). Ukazuje se ovšem, že dominance laktobacilů ve vagině je pouze doménou člověka. U ostatních živočichů se rod *Lactobacillus* vyskytuje v nižších abundancích a převažují jiné bakteriální rody. Prokázáno to bylo například u krys (Yamada et al., 1983; Noguchi et al., 2003), křečků (Noguchi et al., 2003), myší (Noguchi et al., 2003; Barfod et al., 2013), některých hospodářských zvířat (Swartz et al., 2014) a psů (Noguchi et al., 2003; Hutchins et al., 2014).

Složení vaginální mikrobioty není konstantní, ale mění se v závislosti na právě probíhající fázi estrálního cyklu (Larsen et al., 1976, 1977; Yamada et al., 1983; Cowley a Heiss, 1991; Noguchi et al., 2003). Ten u hlodavců trvá obvykle čtyři až pět dní a skládá se ze čtyř fází: proestrus, estrus, metestrus a diestrus (Mandl, 1951; Marcondes et al., 2002). Jeho průběh je řízen pohlavními hormony, jako jsou zejména folikulostimulační hormon, estrogen, luteinizační hormon a progesteron (Butcher et al., 1974; Walmer et al., 1992). Ve vagině laboratorních myší i krys se během proestru a estru

nachází signifikantně více bakterií, než v následujících fázích – metestru a diestru (Larsen et al., 1976; Cowley a Heiss, 1991). Zatímco k největšímu nárůstu bakterií dochází v estru, v metestru jejich množství výrazně klesá (Larsen et al., 1977). Tento snížený bakteriální stav přetrvává až do diestru (Noguchi et al., 2003). V proestru začínají bakteriální populace opět růst (Larsen et al., 1976). Největší přírůstek ve vagině laboratorních myši během estru vykazovaly rody *Lactobacillus* a *Streptococcus* (Cowley a Heiss, 1991). Fluktuace bakteriálních populací ve vagině byla dále detekována například i u křečků a psů (Noguchi et al., 2003).

Jeden z faktorů, který ovlivňuje množství bakterií ve vagině je činnost imunitního systému. Ta je výrazně snížena během estru, tedy období, kdy dochází k páření. Tím se zvyšuje šance na přežití spermií v reprodukčním traktu samice a na úspěšné oplození vajíčka. V následujících fázích je funkce imunitního systému navracena do běžného stavu a vaginální prostředí je tak chráněno před kolonizací patogenními mikroorganismy (Kaushic et al., 1998). Nejvíce imunitních buněk se ve vagině laboratorních krys nacházelo právě v průběhu metestru a diestru (Larsen et al., 1976, 1977). V diestru bylo zaznamenáno například větší množství granulocytů, makrofágů i dendritických buněk, než v estru (Kaushic et al., 1998). Ukazuje se však, že množství bakterií ve vagině je během estru do určité míry regulováno pomocí zvýšené exprese některých antimikrobiálních proteinů. Mezi takové proteiny u divokých myši patří zejména mucin 1, který je v estru exprimován až 4,5 x více, než v ostatních fázích. Dalšími proteiny jsou například uromodulin, lipopolysacharid vázající protein a také ovostatin s LYG1 (z angl. lysozyme g-like protein), jejichž exprese je v následující fázi významně snížena. Taktéž v metestru se objevují proteiny s antibakteriálními účinky, u kterých byla zaznamenána zvýšená genová exprese. Patří k nim především proteiny z rodiny katelicidinů, které jsou označovány za antibiotika, jako je CAMP (z angl. cathelicidin antimicrobial peptide) a NGP (z angl. neutrophilic granule protein) (Černá et al., 2017).

Nárůst bakterií během estru může být způsoben i zvýšenou sekrecí žláz ve vagině. V této fázi dochází k největší tvorbě hlenu a jeho složky mohou pro bakterie sloužit jako kultivační medium (Noguchi et al., 2003). V estru se ve vagině nachází také velké množství epiteliálních keratinizovaných buněk (Goldman et al., 2007; Byers et al., 2012). Ukázalo se, že zvýšený výskyt bakterií úzce souvisí s přítomností právě tohoto buněčného typu (Larsen et al., 1976; 1978). Keratinizované buňky mohou pro bakterie představovat zdroj živin a podporovat tak jejich růst (Yamada et al., 1983)

1.4 Mikrobiota oka

Závěry vědeckých prací z posledních let naznačují, že mikrobiota se nachází také na povrchu oka (Graham et al., 2007; Huang et al., 2016; Leger et al., 2017; Wen et al., 2017). Je však složité tyto bakterie rozeznat od bakterií, které se do oka dostaly z okolního prostředí a představují spíše přechodné mikroorganismy. Na spojivce laboratorních myší C57BL/6 byly detekovány bakterie *Corynebacterium mastidis* (*C. mast*), které příznivě ovlivňují imunitní systém svého hostitele. Výskyt těchto bakterií spouští reakci $\gamma\delta$ T-lymfocytů produkující interleukiny 17 (IL-17), které následně způsobují migraci neutrofilů do této oblasti. Stafylokokové, kteří byli také identifikováni v oku těchto myší, neměli na produkci IL-17 významný účinek. K potvrzení pozitivního vlivu *C. mast* na imunitní reakci hostitele byly využity GF a SPF myši, kterým byla podávána antibiotika. U obou skupin myší docházelo k redukci $\gamma\delta$ T-lymfocytů produkující interleukiny, snížené migrace neutrofilů a také k redukci exprese některých genů z rodiny IL-17. U SPF myši také chyběl jeden z hlavních antimikrobiálních peptidů, který se běžně nachází v slzách. Tyto změny zhoršovaly obranyschopnost oka vůči patogenům, kterým byly myši vystaveny a docházelo u nich k rozvoji bakteriální i houbové infekce oka (Leger et al., 2017).

Huang et al. (2016) detekovali ve vzorcích získaných stěrem očních spojivek lidí celkem 25 bakteriálních kmenů a 526 rodů. Mezi nejvíce dominantní kmene patřily Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes a Bacteroidetes. Rody, které se s různou abundancí vyskytovaly téměř ve všech vzorcích, byly *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Millisia*, *Anaerococcus*, *Fingoldia*, *Simonsiella* a *Veillonella*. Různé druhy stafylokoků (*Staphylococcus epidermidis*, *S. lentus*, *S. xylosus*) byly v oku identifikovány také metodou kultivace (Graham et al., 2007). Mezi další rody nalezeny v oku se řadí například i *Propionibacterium* (Graham et al., 2007; Wen et al., 2017).

1.5 Mikrobiota nosní sliznice

Mikrobiota nosní sliznice se podílí na vývoji čichového epitelu. GF myši měly oproti SPF myším výrazně tenčí řasinkovou vrstvu nacházejících se na čichových neuronech. Také u nich byla zaznamenána nižší úroveň apoptózy a proliferace čichových buněk (François et al., 2016). Nově se také ukazuje, že mikrobiota vyskytující se v nose hostitele by mohla mít vliv na čich (Koskinen et al., 2018). V publikaci od Koskinen et al. (2018) byli účastníci experimentu dle olfaktorických schopností rozděleni do tří skupin: nadprůměrně normosmičtí, průměrně normosmičtí a hyposmičtí. Poté jim byly odebrány vzorky pocházející z čichové sliznice, ze kterých byla následně analyzována skladba mikrobioty. Výsledky prokázaly, že tato skladba je signifikantně odlišná mezi všemi olfaktorickými skupinami. U hyposmické skupiny byla objevena největší bakteriální diverzita a také vyšší abundance bakterií, které jsou producenty butyrátu. Jedná se například o zástupce taxonů Lachnospiraceae, Enterobacteriaceae, *Faecalibacterium* a *Porphyrromonas*. Vyšší koncentrace této silně páchnoucí látky může být tedy odpovědná za horší čichové schopnosti. Rozdíl v olfaktorické funkci, respektive v odpovědi čichových neuronů na přítomnost odorantů, byl zaznamenán také mezi GF a SPF myšmi. U GF myši docházelo například k rychlejší detekci těchto látek. Vysvětlení může být takové, že bakterie pro odoranty, které se dostávají k čichovým receptorům, představují bariéru. S odlišnou čichovou funkcí souvisí také změna v genové expresi některých proteinů týkající se jak detekce, tak i detoxikace odorantů a transdukce olfaktorických signálů. GF myši měly například vyšší expresi genů kódující některé OBP (odorant vázající protein, z angl. odorant binding protein), ale naopak nižší expresi genů, které se podílí na transdukci signálů (François et al., 2016).

U laboratorních myši kmene BALB/c bylo složení mikrobioty v nosní dutině a dalších částech dýchacího traktu (hltna, průdušnice a průdušky) detekováno pomocí kultivačních metod. Mezi nejvíce abundantní rody patřily *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Streptococcus*. Zatímco relativní frekvence rodů *Staphylococcus* a *Micrococcus* se směrem od nosní dutiny do dalších částí dýchacího traktu snižovala, u rodu *Streptococcus* tomu bylo naopak. Nejnižší relativní frekvence streptokoků byla naměřena v nosní dutině, největší pak v průduškách. V nosní dutině byly dále identifikovány taxony jako *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Enterobacteriaceae* a v nízkých abundancích i rody *Corynebacterium* a *Lactobacillus* (Cangemi de Gutierrez et al., 1999). U laboratorních myši kmene C3H/HeN byla skladba mikrobioty v čichovém epitelu

odhalena sekvenováním 16S rRNA genu. Převažovaly zde bakteriální kmeny Bacteroidetes a Firmicutes, dalšími kmeny byly zejména Proteobacteria a Actinobacteria. U každého kmene dominovala převážně jen jedna nebo několik málo čeledí: Bacteroidaceae (kmen Bacteroidetes), Enterococcaceae, Lachnospiraceae a Ruminococcaceae (Firmicutes), Enterobacteriaceae (Proteobacteria) a Bifidobacteriaceae (Actinobacteria) (François et al., 2016). U dalšího hlodavce - křečka bavlníkového (*Sigmodon hispidus*) se ukázalo, že téměř 50 % bakterií obývajících nosní dutinu se řadí do rodu *Campylobacter*. Mezi další přítomné bakteriální rody patřily například *Catonella*, *Acholeplasma*, *Streptobacillus* a *Capnocytophaga* (Chaves-Moreno et al., 2015).

Složení mikrobioty v nosní dutině bylo zkoumáno také u psů a koček domácích. Nejvíce abundantní kmen a třídu představovaly taxony Proteobacteria (následován kmeny Bacteroidetes a Firmicutes) a Gammaproteobacteria. U psů a koček byl nejhojnějším rodem *Moraxella* (Dorn et al., 2017; Isaiah et al., 2017; Tress et al., 2017). Ten byl s různou abundancí nalezen ve všech 23 vzorcích pocházejících z nosní dutiny psů a zahrnoval téměř 60 % všech nalezených taxonů. Dalšími abundantními rody u psů byly například *Phyllobacterium*, nespécifikovaný rod z čeledi Cardiobacteriaceae, *Staphylococcus* (Tress et al., 2017), *Mycoplasma*, *Prevotella*, *Helcococcus*, *Cardiobacterium* a neklasifikovaný rod uvnitř kmene BD1-5 a čeledě Weeksellaceae (Isaiah et al., 2017). U kočky pak zejména taxony Bradyrhizobiaceae, *Sediminibacterium*, *Alloiococcus* a Neisseriaceae (Dorn et al., 2017).

V nosní dutině lidí naopak převažuje kmen Actinobacteria, následovaný kmeny Firmicutes a Proteobacteria (Bassis et al., 2014; Koskinen et al., 2018). Z kmene Actinobacteria jsou nejhojnějšími čeleděmi Corynebacteriaceae a Propionibacteriaceae (Bassis et al., 2014). Nejhojnějšími rody jsou *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Dolosigranulum* a *Peptoniphilus* (Koskinen et al., 2018).

1.6 Mikrobiota ústní dutiny

V ústní dutině se nachází bakterie, které se podílí např. na metabolismu dusíkatých látek. Tyto bakterie redukují dusičnany/nitráty (NO_3^-) za vzniku dusitanů/nitritů (NO_2^-). Účastní se tak prvního kroku reakce, na jejímž konci se v žaludku vytváří oxid dusnatý (NO) (Tannenbaum et al., 1974; Li et al., 1997; McKnight et al., 1997). Ten pozitivně ovlivňuje funkci kardiovaskulárního systému i gastrointestinálního

traktu (Björne et al., 2004; Webb et al., 2008; Kapil et al., 2013). Například u laboratorních kryš v zadní části jazyka tvořily bakterie redukující dusičnany až 65 % všech kultivovatelných bakterií. Patřily mezi ně zejména rody *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Streptococcus* a *Listonella*. Dále zde byla potvrzena pozitivní korelace mezi hustotou těchto bakterií a produkcí dusitanů (Li et al., 1997).

U kryš, které byly vyživovány roztokem dusičnanu sodného (NaNO_3) docházelo k signifikantnímu nárůstu bakterií redukující dusičnany a v důsledku toho i k zvýšené koncentraci NO_x v krevní plasmě. Těmto kryšám byl naměřen také nižší krevní tlak (Hyde et al., 2014). V jiném experimentu dostávaly laboratorní kryšy roztok NaNO_3 , ale zároveň byla jejich ústní dutina ošetřována antibakteriálním přípravkem. Ten výrazně snížil množství bakterií v ústech, včetně těch redukujících dusičnany. Oproti kontrolní skupině, která byla vyživována stejným způsobem, avšak bez narušení orální mikrobioty, došlo u těchto kryš k výraznému oslabení účinku podávaného roztoku na organismus. Těmto kryšám byl naměřen vyšší krevní tlak a nižší schopnost ochrany žaludeční sliznice před akutním poškozením. Tomu odpovídala i nižší hladina dusitanů v krevní plasmě a NO v žaludku. Pokud byl kryšám podáván přímo roztok dusitanů sodného (NaNO_2), výsledné hodnoty měření krevního tlaku i gastroprotektivní funkce byly podobné jako u kontrolní skupiny (Petersson et al., 2009).

I přesto, že ústní a nosní dutina jsou umístěny blízko sebe, skladba a diverzita jejich mikrobioty se mezi těmito dvěma místy signifikantně odlišuje. Například zatímco v ústní dutině psů se nejčastěji vyskytuje kmen *Bacteroidetes* následován kmenem *Proteobacteria*, v nosu je tomu naopak. Rozdíly jsou i na rodové úrovni. U psů byla také naměřena vyšší bakteriální diverzita u vzorků pocházejících z bukální oblasti, než u vzorků z nosu (Isaiah et al., 2017).

Pomocí metody kultivace byla v ústní dutině laboratorních myší prokázána přítomnost stafylokoků (*Staphylococcus aureus*, *S. cohnii*, *S. sciuri*), streptokoků (*Streptococcus sanguis*), enterokoků (*Enterococcus faecalis*) a laktobacilů (*Lactobacillus murinus*) (Gadbois et al., 1993; Rodrigue et al., 1993; Rodrigue a Lavoie, 1996; Trudel et al., 1986). Podobné výsledky byly potvrzeny i metodou sekvenování DNA. Nejvíce sekvencí pocházelo z kmene *Firmicutes*, druhým nejhojnějším kmenem byl kmen *Proteobacteria* a téměř u všech myší převažoval výskyt bakterií rodu *Streptococcus*. Oproti předchozím publikacím byly ve slinách objeveny i bakterie rodu *Halomonas* (Chun et al., 2010). U kryš byla detekována mikrobiota, která se nachází na povrchu jazyka. Na rozdíl od myší se stal nejhojnějším taxonem kmen *Actinobacteria* a až poté

následovaly kmeny Firmicutes a Proteobacteria. Nejvíce abundantními rody byly neklasifikovaný rod z čeledi Micrococcaceae, *Corynebacterium*, *Streptococcus* a *Haemophilus* (Hyde et al., 2014). Ve slinách netopýrů dominuje kmen Proteobacteria a rody *Pasterurella* a neklasifikovaný rod z čeledi Neisseriaceae (Dietrich et al., 2017).

Složení orální mikrobioty se může lišit mezi různými laboratorními kmeny myší. V publikaci Gadbois et al. (1993) byl rozdíl v této mikrobiotě prokázán mezi všemi šesti zkoumanými kmeny. Ty se od sebe odlišovaly například výskytem různých druhů streptokoků. Po uplynutí jednoho týdne, kdy myši žily ve stejných podmínkách, nebyl rozdíl mezi většinou kmenů již nadále signifikantní. To naznačuje, že rozdíl byl způsoben různým původem zvířat. Rozdíl ve složení mikrobioty byl objeven také u jedinců ze stejného kmene, kteří pocházeli od různých dodavatelů. Nicméně v tomto případě se složení mikrobioty po týdnu významně nezměnilo (Rodrigue a Lavoie, 1996).

Dominantním kmenem orální mikrobioty psa je taxon Bacteroidetes, po něm následují kmeny Proteobacteria, Firmicutes a Fusobacteria. Mezi rody se jedná zejména o taxon *Porphyromonas* (Sturgeon et al., 2013; Isaiah et al., 2017). Dalšími abundantními rody jsou *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Derxia* a *Moraxella* (Sturgeon et al., 2013). Složení mikrobioty se signifikantně lišilo mezi psy ze dvou lokalit, mezi psy z různých věkových skupin a také mezi několika vybranými plemeny. Naopak efekt pohlaví neměl vliv na bakteriální diverzitu ani na kompozici mikrobioty (Isaiah et al., 2017).

Mezi nejvíce abundantní bakteriální kmeny v ústní dutině lidí patří Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria a TM7 (Aas et al., 2005; Lazarevic et al., 2009). Nejhojnějšími rody jsou *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus*, *Veillonella* a *Neisseria* (Aas et al., 2005; Lazarevic et al., 2009). Ukazuje se však, že mnoho bakterií v ústech je místně specifických a bakteriální profily v různých oblastech, například na povrchu jazyka, patra, dásní a zubního plaku, se od sebe do určité míry odlišují. Rozdíly ve skladbě bakterií se nachází i v rámci jedné oblasti, jako například na dorzální a laterální straně jazyka. Naopak bakterie *Streptococcus mitis* a *Granulicatella adiacens* byly detekovány ve všech zkoumaných částech ústní dutiny (Aas et al., 2005).

1.7 Pohlavně specifické složení mikrobioty

Vliv pohlaví na složení mikrobioty byl prokázán především u vzorků ze střevní sliznice či trusu laboratorních hlodavců. Ukazuje se, že silnější vliv na utváření střevní mikrobioty má genotyp, tedy laboratorní kmen ze kterého zkoumané myši a krysy pochází. Kovacs et al. (2011) porovnávali vliv genotypu a pohlaví u osmi linií laboratorních myší. Střevní mikrobiota myší ze stejných kmenů byla podobnější, než mezi myšmi stejného pohlaví pocházejících z různých kmenů. Také u myší z celkem 89 laboratorních kmenů nebyl detekován významný efekt pohlaví, pokud byla zkoumána celá populace dohromady. Až v rámci jednotlivých kmenů se podařilo nalézt mnoho odchylek mezi pohlavími v diverzitě i skladbě mikrobioty (Org et al., 2016). Také Elderman et al. (2018) zkoumali vliv pohlaví na střevní mikrobiotu u dvou kmenů myší BALB/c a C57BL/6, z nichž každý obsahoval 10 samic a 10 samců. U samců byla naměřena nižší bakteriální diverzita a druhová bohatost, než u samic. Vlivem genotypu na složení mikrobioty bylo vysvětlováno 26,5 % rozdílu, kdežto vlivem pohlaví 11,6 %. Konkrétní bakteriální druhy či rody, které se svou relativní abundancí mezi samci a samicemi významně lišily, byly mezi těmito myšími kmeny odlišné. Například u samic kmene BALB/c bylo detekováno signifikantně více bakterií rodu *Bifidobacterium*, než u samců. U druhého kmene nebyl tento rod svou četností mezi pohlavími významně odlišný, ale samice měly například větší abundanci bakterií rodů *Enterococcus* a *Turibacteri*, než samci (Elderman et al., 2018).

Jednou z možností, kterými jsou vysvětlovány rozdíly ve střevní mikrobiotě mezi samci a samicemi, je působení pohlavních hormonů. Jejich vliv na střevní mikrobiotu byl prokázán u myší, kterým byla provedena gonadektomie, tedy odstranění pohlavních žláz. U takových myší docházelo k signifikantním změnám ve složení mikrobioty oproti nekastrovaným jedincům. Pokud byl samcům po provedení gonadektomie podáván testosteron, změnám v mikrobiotě bylo zabráněno (Org et al., 2016). Skladba střevní mikrobioty byla porovnávána také mezi jedinci obou pohlaví v období prepubescence a postpubescence. Rozdíly v alfě a beta diverzitě byly prokázány pouze mezi postpubescentními samci a samicemi, což opět naznačuje možný vliv pohlavních hormonů na mikrobiální složení. Skladba mikrobioty samců se v průběhu dospívání lišila, kdežto mikrobiota samic nedosahovala v období před a po pubertě významných změn. Vzhledem k těmto výsledkům byla prepubescentním samcům, pro potvrzení role samčích androgenů v mezipohlavních mikrobiálních rozdílech, provedena gonadektomie.

Mikrobiota dospělých kastrátů byla následně více podobná mikrobiotě samic, než nekastrovaným samcům (Yurkovetskiy et al., 2013). Vliv puberty a s tím související účinek pohlavních hormonů na diferenciaci střevní mikrobioty mezi pohlavími byl prokázán i ve výzkumu Markle et al. (2013). Zde byla střevní mikrobiota zkoumána u samců a samic myší starých pouhé tři týdny, v období puberty a u již dospělých jedinců. Pohlavní rozdíly ve složení mikrobioty se začaly projevovat až během puberty a přetrvávaly do dospělosti, kde byly nejvíce znatelné.

Mezipohlavní rozdíly ve složení mikrobioty byly prokázány i u člověka. Muži mají ve střevě vyšší zastoupení kmene Bacteroidetes, než ženy (Dominianni et al., 2015). Také Mueller et al. (2006) prokázali vyšší zastoupení bakterií ze skupiny Bacteroides – Prevotella z kmene Bacteroidetes u mužů, než u žen. Další odchylky ve složení mikrobioty mezi muži a ženami byly nalezeny v různých oblastech na povrchu kůže. Callewaert et al. (2013) detekovali v podpaží 53 účastníků dva hlavní bakteriální klastry, kde v jednom z nich dominoval rod *Staphylococcus* a ve druhém rod *Corynebacterium*. Mikrobiota podpaží 87 % žen spadala do prvního z uvedených klastrů, u mužů naopak převládal druhý klast. Vyšší abundance rodu *Corynebacterium* v podpaží mužů byla prokázána i v další publikaci. K tomuto rodu přibyly i další rody jako například *Anaerococcus* a *Peptoniphilus*. U mužů byla objevena i tendence k vyšší Shannonově diverzitě a počtu OTU, než u žen (Troccaz et al., 2015). K dalším místům s pohlavními rozdíly v mikrobiotě na kůži patří například dlaně a předloktí. U žen byla na obou těchto místech naměřena vyšší bakteriální diverzita, než u mužů (Fierer et al., 2008; Staudinger et al., 2011). Ženy měly na dlaních vyšší relativní abundanci některých bakteriálních taxonů, jako jsou například Enterobacteriales a Lactobacillaceae. Muži měli naopak více bakterií z rodů *Corynebacterium* a *Propionibacterium*. Bylo potvrzeno, že tyto rozdíly nevznikly v důsledku odlišné frekvence mytí rukou mezi pohlavími (Fierer et al., 2008). Ukázalo se, pohlaví má vliv i na skladbu mikrobioty na povrchu oka. Mikrobiota žen a mužů se signifikantně odlišovala ve frekvenci některých druhů bakterií, zatímco bakteriální alfa diverzita nebyla významně rozdílná (Wen et al., 2017).

1.7 Chemická komunikace

Mikrobiota přispívá i k chemické komunikaci mezi živočichy. U myši se střevní bakterie podílí na syntéze látky trimethylamin, která je dále vylučována spolu s močí a slouží především jako atraktant pro samice. Pokud byla myším podávána antibiotika, koncentrace této látky v moči výrazně poklesla (Li et al., 2013). Některé molekuly sloužící k chemické komunikaci jsou vázány a vylučovány z těla ven pomocí transportních proteinů – lipokalinů (Novotný et al., 2003). Lipokaliny díky schopnosti vázat do své beta barelové struktury různé organické látky, přispívají k detoxikaci organismu. Mezi tyto látky mohou patřit právě i ty, které vznikají při degradaci bakterií nebo jsou produkovány přímo bakteriemi. Následně mohou být spolu s lipokaliny vyloučeny z těla ven a sloužit jako chemický signál (Černá et al., 2017). Změny hladiny exprese lipokalinů v různých stádiích estru by tedy mohly korelovat se změnou mikrobioty. U samic divokých myši bylo v rámci analýzy vaginálního proteomu a jeho změn během estrálního cyklu zjištěno, že genová exprese lipokalinů (MUP20, sMUP17 a sMUP9) se zvyšuje během nástupu estru, kdy zároveň dochází k nárůstu bakteriální populace ve vagině. Je tedy pravděpodobné, že tyto lipokaliny mohou hrát roli při zprostředkování pachové informace o reprodukčním stavu samice.

Analýza dalších sekretů u divoké populace myši domácí, které by mohly sloužit k chemické komunikaci (sliny, slzy, nosní sekret) ukazuje, že lipokaliny jsou tady jedny z nejhojněji zastoupených proteinů (Stopka et al., 2016; Stopková et al., 2017; Kuntová et al., 2018). Mezi nejpočetnější proteiny v nosním sekretu patří lipokaliny jako jsou OBP, MUP (hlavní močové proteiny, z angl. major urinary protein) a LCN (lipokaliny, z angl. lipocalin) a také antimikrobiální proteiny (AMP). AMP u samců tvoří 24,1 % a u samic 16,6 % všech nasálních proteinů. Jedním z nejvíce abundantních AMP v nosu myši je například BPIFB9B (BPI fold containing family B). Ukázalo se, že genová exprese lipokalinů a AMP spolu koreluje. Zřejmě se tedy dohromady podílí na regulaci mikrobioty a obraně proti patogenům, kdy AMP bakterie přímo degradují a lipokaliny mohou následně látky vznikající při tomto procesu vázat do své struktury (Kuntová et al., 2018)

Důkazy pro úlohu bakterií v chemické komunikaci přináší i výzkumy u dalších živočichů. Například v pachových váčcích hyen skvrnitých (*Crocuta crocuta*) se nachází bakterie, které pomocí fermentace produkují látky podílející se na tvorbě pachových značek (Theis et al., 2012; Theis et al., 2013). U hyen ze stejného klanu bylo složení

těchto bakterií podobnější, než mezi jedinci pocházejících z různých klanů. Výsledný pach je tak zřejmě díky jiné skladbě bakterií, a tím pádem i odlišné tvorbě látek během bakteriálního metabolismu, pro každý klan specifický. Hyenám je tedy pomocí pachových značek umožněno rozeznat cizí jedince (Theis et al., 2012). Výše zmíněné rozdíly byly objeveny i mezi samci, laktačními samicemi a březími samicemi. Bakterie tedy přispívají i k získávání informací o pohlaví a reprodukčním stavu jedince, kterému patří pachová značka (Theis et al., 2013). Podobná situace se vyskytuje i u surikat (*Suricata suricatta*). Složení bakterií uvnitř pachových váčků bylo odlišné mezi pohlavími, jedinci z různých skupin, které surikaty přirozeně tvoří a dále i mezi samci s jiným sociálním postavením (Leclaire et al., 2014; Leclaire et al., 2017). S tím souvisí i složení látek produkované fermentujícími bakteriemi, které je podobnější u jedinců ze stejné skupiny, než mezi jedinci z různých skupin a liší se i mezi samci a samicemi (Sarah Leclaire et al., 2017). Dosavadní publikace ukazují na významnou roli mikrobioty v pachové komunikaci, nicméně přesné mechanismy a konkrétní role jednotlivých druhů bakterií zatím nejsou zcela objasněny a jejich objevení bude vyžadovat další výzkumy.

1.8 Cíle diplomové práce

1) Kvantifikovat bakterie ve sliznicích myši domácí

Jedním z cílů je pomocí metody qPCR kvantifikovat bakterie, které se nacházejí ve sliznicích divokých jedinců myši domácí (*Mus musculus musculus*). Mezi zkoumané vzorky patří výplachy nosní sliznice, ústní dutiny, moč, výplachy vaginální sliznice a trus zastupující mikrobiotu v lumen střeva. Výsledné hodnoty z kvantifikace budou následně mezi jednotlivými typy vzorků porovnány dle statistických metod.

Hypotéza: Množství bakterií se mezi různými typy vzorků signifikantně liší.

2) Detekovat diverzitu ve sliznicích myši domácí

Druhým cílem je pomocí sekvenace genu 16S rRNA stanovit bakteriální diverzitu v již výše zmíněných sliznicích. Zaměřeno bude jak na alfa diverzitu, tak i na taxonomické složení mikrobioty na úrovni kmenu, třídy, čeledě a rodu. Výsledné hodnoty budou následně dle statistických metod mezi jednotlivými zkoumanými sliznicemi porovnávány. V předchozích výzkumech se diverzita mikrobioty člověka odlišovala mezi různými částmi těla (Ursell et al., 2012). Předpokládáme tudíž, že stejný výsledek přinese i tato diplomová práce u divokých jedinců myši domácí.

Hypotéza: Alfa diverzita a taxonomické složení mikrobioty se významně liší mezi zkoumanými sliznicemi.

3) Charakterizovat kvantitativní a kvalitativní změny vaginální mikrobioty v průběhu estrálního cyklu myši domácí

Dalším cílem je zjistit, zda se vaginální mikrobiota signifikantně odlišuje mezi jednotlivými fázemi estrálního cyklu a popřípadě tyto změny blíže charakterizovat.

Hypotéza: Vaginální mikrobiota se mění v závislosti na konkrétní fázi estrálního cyklu - proestru, estru, metestru a diestru. Jednotlivé fáze se od sebe liší množstvím bakterií i bakteriální diverzitou.

4) Určit vliv pohlaví na mikrobiotu v sliznicích myši domácí

Práce bude také zaměřena na jeden z faktorů, který by mohl významně ovlivňovat celou mikrobiotu. Cílem bude porovnání mikrobioty mezi samci a samicemi ve všech zkoumaných sliznicích a určit tak vliv pohlaví na bakteriální kvantitu a diverzitu. Výsledky by mohly podpořit hypotézu o roli bakterií v chemické komunikaci mezi myšmi.

Hypotéza: Vliv pohlaví má signifikantní význam pro utváření mikrobioty. Mezi samci a samicemi se objevují rozdíly v její abundanci i diverzitě.

2 Metodika

2.1 Myš domácí

V experimentální části byli použiti dospělí jedinci divokých myší *Mus musculus musculus*. Myši byly buď odchyceny v České republice ve Světlé Hoře (50.038987, 17.403780) a Dolních Břežanech (49.961243, 14.450959) v roce 2017 nebo se jednalo o potomky myší pocházejících z Polska (49.993752, 19.901150), narozených během roku 2016 (F1 generace). I myši pocházející z přímého odchyty pobývaly v chovech po dobu minimálně tří a více měsíců. Vzorky byly celkem získány od 23 jedinců, 11 samců a 12 samic. Myši byly umístěny jednotlivě do plastových klecí s podestýlkou, kde měly přístup k pitné vodě a standardní laboratorní krmné směsi ST-1 (Velaz) *ad libitum*. Teplota v místnosti s myšmi byla udržována na $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ a vlhkost vzduchu se pohybovala kolem 32 %. Světelný režim byl nastavený na 14 hod. (světlo) :10 hod. (tma).

2.2 Odběr vzorků

Testované vzorky pocházely z výplachů nosní sliznice, výplachů ústní dutiny, moči, výplachů vaginální sliznice a trusu myší. Pro lepší orientaci v textu mohou být některé tyto vzorky dále nazývány také ve zkrácené verzi: výplachy nosní dutiny = nosní sliznice, výplachy ústní dutiny = sliny (ačkoliv pomocí výplachů byly pravděpodobně získány nejen bakterie ve slinách, ale také bakterie přítomné na stěnách ústní dutiny či na povrchu zubů) a výplachy vaginální sliznice = vaginální sliznice. Mikrobiota střevní sliznice je zde reprezentována pouze vzorky trusu. V potaz je třeba brát fakt, že mikrobiota střevní sliznice a lumen střeva se může do jisté míry odlišovat (Linnenbrink et al., 2013). Počet samců a samic myší, od kterých byly vzorky získány, jsou uvedeny v Tab. č. 1.

Tab. č. 1: Počet samců a samic použitých pro odběr vzorků pro jednotlivé typy sliznic.

Typ vzorku	Počet samců	Počet samic
Nosní sliznice	9	10
Sliny	10	10
Moč	7	10
Vaginální sliznice	-	10
Trus	10	9

Pro odběr vzorků moči a trusu byly využity uzavíratelné plastové krabičky. Ty byly před použitím vloženy do flowboxu, kde byly 20 minut ozářeny UV světlem, které poškozují bakteriální DNA. Tímto způsobem bylo získáno poměrně sterilní prostředí vhodné k odběru našich vzorků. Myš byla do krabičky zavřena a po vykonání potřeby ihned přenesena zpět do klece. Krabička obsahovala destičku s malými otvory, kterými se moč a trus dostávaly až na dno krabičky. Byly odebírány pouze takové vzorky, které byly v dostatečné vzdálenosti od druhého typu vzorků, aby nedocházelo k vzájemné kontaminaci. Do mikrozkuvek byla moč přenesena pomocí pipety a trus odebrán pomocí sterilních špiček. Konečné vzorky byly tvořeny ze tří odběrů.

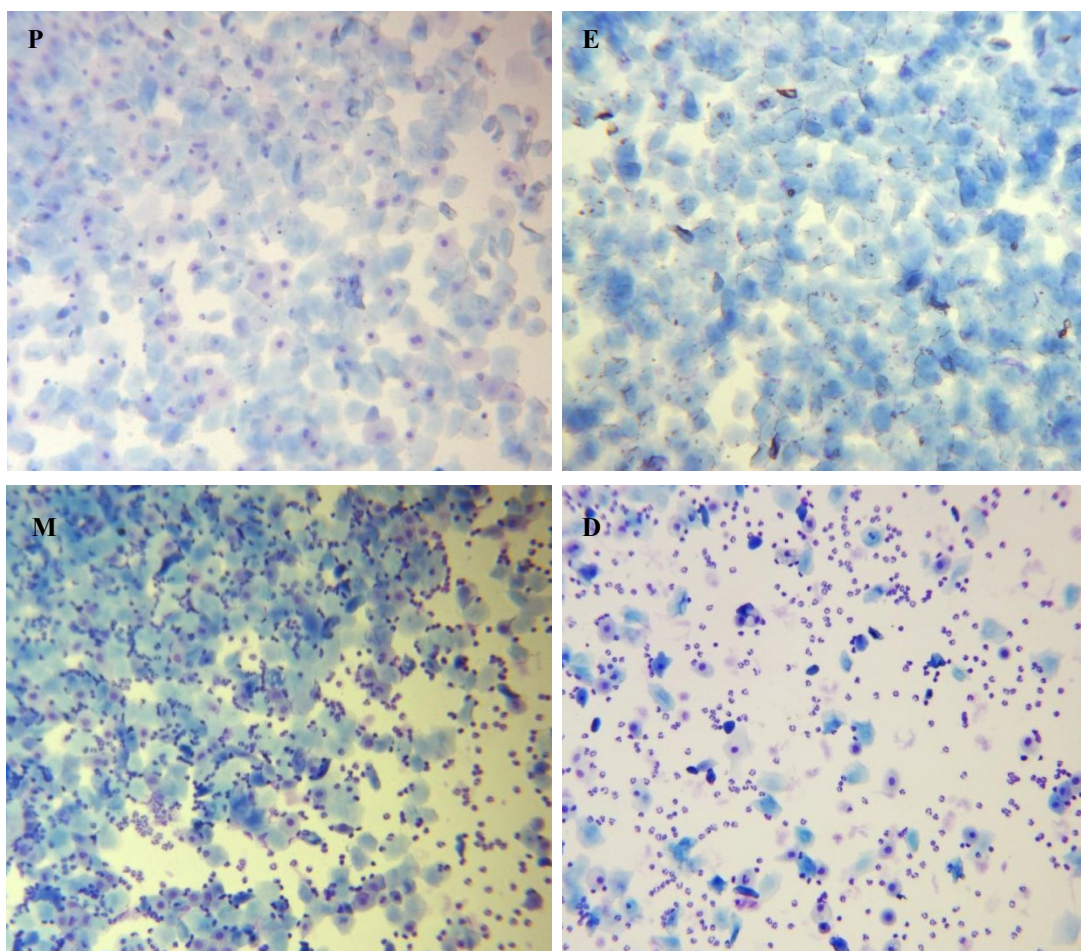
Následující vzorky byly získány pomocí výplachů příslušných částí těla myši. Myš byla standardním způsobem uchopena a následně byl proveden výplach pomocí pipety s filtrovými špičkami s určitým objemem sterilní vody. Poté byly vzorky dány do sterilních mikrozkuvek. Vzorky slin byly získávány vyplachováním ústní dutiny s 30 μ l sterilní vody. Vzhledem k tomu, že myši často tuto vodu z větší části vypily, musely se výplachy opakovat několikrát po sobě. Výsledný vzorek je tvořen výplachy pocházejícími z pěti dní. Vaginální vzorky byly odebírány vždy každé dopoledne po dobu pěti po sobě následujících dní. První den po dokončení odběru byla samicím přidána do klece podestýlka od samců pro nastartování estru. Výplachy byly prováděny s 20 μ l sterilní vody. Pro získání dostatečného objemu vzorku byl výplach většinou každý den dělán dvakrát. Poslední vzorky představovaly výplachy nosní sliznice (obě nozdry) s 10 μ l sterilní vody. U každé myši byly výplachy provedeny čtyřikrát v průběhu dvou dní. Všechny vzorky byly následně uloženy do - 80 °C.

2.3 Určení fáze estrálního cyklu

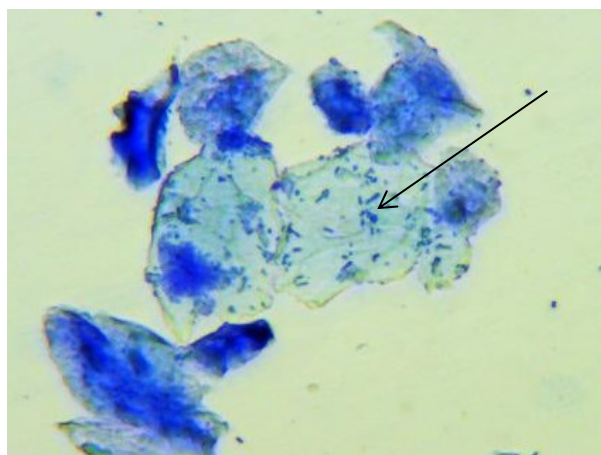
Na podložní sklíčko bylo nanášeno 5 μ l vzorku z výplachu vaginální sliznice. Před samotným barvením byl vzorek necháván volně zaschnout. Následně byl barven roztokem May-Grünwald po dobu 5 min, dále byl vložen na 1 min do PBS pufru a v posledním kroku byl 7 min ponechán v Giemsa roztoku. Po dokončení barvení byl vzorek opět nechán volně zaschnout.

Následně bylo sklíčko zkoumáno pod světelným mikroskopem. Rozlišovacím znakem mezi jednotlivými fázemi estrálního cyklu byl poměr třech typů buněk: jaderné epitelální buňky, keratinizované epitelální buňky, které již jádro neobsahují a leukocyty.

Proestrus byl určen u vzorků, které obsahovaly především jaderné epitelální buňky. Další dva typy buněk byly také přítomné, ale v menší míře. Estrus byl určen v případě dominance keratinizovaných epitelálních buněk. Leukocyty se v této fázi estrálního cyklu vyskytují nejméně. Metestrus byl charakterizován přítomností všech tří typů buněk s podobnou hojností. Diestrus byl identifikován na základě dominance leukocytů. K identifikaci fáze estrálního cyklu dopomáhal i rozdíl v konzistenci vzorku při jeho nanášení na podložní sklíčko (Goldman et al., 2007; Byers et al., 2012). Ukázkou zobrazení jednotlivých fází estrálního cyklu ve vzorcích, které pochází od samic testovaných v této práci, poskytuje Obr. č. 2. Při tomto barvení lze pozorovat i shluky bakterií, které se vyskytují na povrchu keratinizovaných epitelálních buněk (Obr. č. 3).



Obr. č. 2: Zobrazení jednotlivých fází estrálního cyklu pod světelným mikroskopem. Barveno pomocí May-Grünwald a Giemsa roztokem. Označení fází: P = proestrus, E = estrus, M = metestrus, D = diestrus. Zvětšení: 200x.



Obr. č. 3: Zobrazení bakteriálních shluků na vaginálních buňkách pod světelným mikroskopem. Barveno pomocí May-Grünwald a Giemsa roztokem. Příklad shluku bakterií je označen šipkou. Zvětšení: 400x.

2.5 Izolace DNA

Vzhledem k možné kontaminaci vzorků z okolního prostředí byla izolace DNA prováděna ve flowboxu, který byl předem ozářen UV světlem po dobu 20 minut. Při manipulaci se vzorky byly používány pouze pipetovací špičky s filtrem. Izolace DNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin® Tissue od společnosti Machery-Nagel. DNA byla izolována ze vzorků moči, trusu, slin, z výplachů sliznice vagin a nosu a také z bakteriální kultury laktobacilů, která později sloužila k vytvoření kalibrační křivky. U všech vzorků, kromě těch s trusem, byl použit stejný protokol z uživatelského manuálu pro izolaci bakteriální DNA. Izolace probíhala současně pouze u jednoho typu vzorků a vždy v ní byly zahrnuty dva typy negativních kontrol. Jedna obsahovala sterilní vodu a druhá pouze použité roztoky pro odhalení případného mikrobiomu v kitu – „kitom“. Počáteční objemy, z kterých byla DNA izolována, se lišily mezi různými typy vzorků. U moči to bylo 200 μ l, u slin 30 μ l a u výplachů ze sliznice vaginy a nosu 20 μ l. Negativní kontrola s vodou měla vždy stejný objem jako příslušný typ vzorků. Vzorky moči byly nejprve centrifugovány při 13 000 rcf na 15 min. Poté byl odebrán supernatant a v dalších krocích byla použita jen peleta.

Ke vzorkům bylo přidáno 180 μ l lyzačního pufru (Buffer T1) a 25 μ l proteinázy K. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány na 3 hod při 56 °C v třepacím termobloku.

Následně k nim bylo přidáno 200 µl dalšího lyzačního pufru (Buffer B3) a po zvortexování byly vzorky podruhé inkubovány, tentokrát na 10 min při 70 °C. Tím došlo k rozrušení buněčné stěny a dalších komponentů buňky a také k degradaci proteinů. Po inkubaci byla DNA precipitována pomocí 210 µl 97% ethanolu a vzorky byly opět zvortexovány. V dalších krocích byl celý objem vzorku přenesen do kolonky umístěné na sběrné zkumavce a centrifugován při 11 000 rcf na 1 min. V tomto bodě byla DNA navázána na silikátovou membránu kolonky. Ta byla v další fázi promývána pomocí 500 µl promývacího pufru (Buffer BW) a následné centrifugace při 11 000 rcf na 1 min. Celý proces byl zopakován s 600 µl dalšího promývacího pufru (Buffer B5), který byl před použitím dle pokynů zředěn ethanolom. Pro odstranění zbylého ethanolu byla kolonka znovu centrifugována při 11 000 rcf na 1 min. Nakonec byla kolonka umístěna do nové mikrozkuhavky a DNA byla rozpuštěna v elučním pufru (Buffer BE). Nejprve bylo přidáno 50 µl elučního pufru s následnou inkubací v pokojové teplotě na 1 min a centrifugací při 11 000 rcf na 1 min. Celý proces byl zopakován s 30 µl elučního pufru. Vzorky DNA byly následně skladovány při - 80 °C.

Pro izolaci DNA z trusu byl použit specifický protokol z uživatelského manuálu přímo pro tento typ vzorku. Od jednotlivých myší byly použity exkrementy o celkové hmotnosti přibližně 160 mg (4 kusy). Do mikrozkuhavky s exkrementy bylo dále přidáno 1 ml vody a vše bylo 1 min vortexováno. Poté byly kusy exkrementů vyjmuty a zbytek byl centrifugován při 4 000 rcf na 15 min. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant. Dále bylo ke vzorkům přidáno 200 µl lyzačního pufru (Buffer T1), 25 µl proteinázy K a následně bylo vše zvortexováno a inkubováno na 3 hod při 56 °C. Následující kroky se skládaly z přidání 200 µl dalšího lyzačního pufru (Buffer B3), vortexování a inkubace na 15 min při 70 °C. Poté byla teplota na dobu 10 min zvýšena na 90 °C. Další postup, začínající přidáním 210 µl 97% ethanolu, byl již stejný jako u předchozích vzorků.

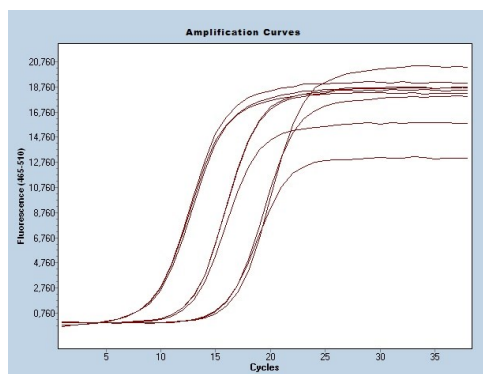
2.6 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Pro odhadovaný počet bakterií v jednotlivých sliznicích byla použita metoda qPCR. Je důležité zmínit, že tato metoda nerozlišuje mezi DNA pocházející z živých a mrtvých bakteriálních buněk. Dalším úskalím je fakt, že různé bakteriální taxony mohou mít odlišný počet kopií 16S rRNA (Kralik a Ricchi, 2017). Výsledné hodnoty jsou tedy spíše orientační a slouží především k porovnávání rozdílů bakteriálních abundancí mezi zkoumanými sliznicemi na úrovni řádů. Příprava vzorků pro qPCR byla provedena ve

flowboxu, který byl předem vysvícen na 20 min UV zářením. Používány byly pouze pipetovací špičky s filtrem pro zabránění kontaminace vzorků. Pro amplifikaci V3-V4 variabilní oblasti genu 16S rRNA byly použity univerzální bakteriální primery: forward S-D-Bact-0343-a-S-15 (5'-TACGGRAGGCAGCAG-3') a reverse S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et al., 2013).

Reakční směs pro jeden vzorek se skládala z 5 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), který obsahuje FastStart Taq DNA polymerázu, fluorescenční barvivo SYBR Green I, směs dNTP, reakční pufr a MgCl₂. Dalšími složkami byly 1 µl forward primeru, 1 µl reverse primeru a 3 µl vzorku DNA. Oba primery byly naředěny na koncentraci 5 µM. Jak již bylo zmíněno výše, DNA pocházela ze vzorků moči, trusu, slin a z výplachů sliznice vagin a nosu. Dalšími vzorky byly veškeré negativní kontroly z izolace DNA, negativní kontrola qPCR, která namísto DNA obsahovala 3 µl sterilní vody (NTC = no template control) a ředící řada pro tvorbu kalibrační křivky. Tato ředící řada obsahovala DNA izolovanou z kultury laktobacilů ve třech různých bakteriálních koncentracích: 10e9, 10e8, 10e7.

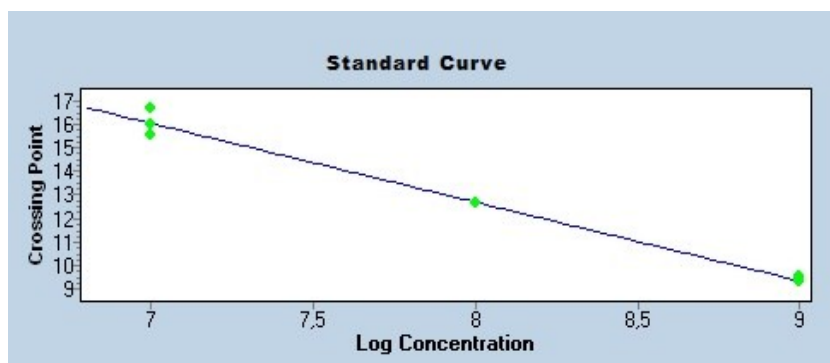
Reakce probíhaly na PCR destičce s 384 jamkami. Reakční směs byla vždy připravena najednou pro všechny vzorky na destičce. Obsahovala všechny složky vyjma DNA, která byla do jamek přenesena až na konec. Před použitím byly jednotlivé složky vždy zvortexovány a každý vzorek byl dělán v triplicátech. V konečné fázi byla destička zakryta průhlednou folií a centrifugována při 15 000 rcf na 1 min. qPCR probíhala v přístroji LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Počáteční denaturace byla nastavena na 95 °C/5 min, dále následovalo 38 cyklů sestávajících z denaturace - 95 °C/40 s, annealingu - 55 °C/1 min a extenze - 72 °C/1 min. Fluorescenční barvivo po navázání na DNA vysílalo záření, které bylo během každého cyklu zachycováno přítomnými senzory a zaznamenáváno programem LightCycler 480 ve formě amplifikačních křivek (Obr. č. 4).



Obr. č. 4: Zobrazení amplifikačních křivek v programu LightCycler 480 pro vzorky ředící řady.

Program na základě metody maxima druhé derivace určil pro každý vzorek hodnotu C_p (z angl. crossing point). Hodnota udává číslo cyklu, ve kterém intenzita fluorescence překročila tzv. fluorescenční práh a dosahovala tak exponenciální fáze amplifikační křivky. Na základě známé koncentrace bakterií vzorků z ředící řady byla vytvořena kalibrační křivka (Obr. č. 5) a zhodnocena efektivita PCR reakce. S použitím této kalibrační křivky byly v programu dopočítány příslušné koncentrace bakterií k námi zkoumané DNA.

Error: 0,00584
Efficiency: 1,987
Slope: - 3,354
YIntercept: 39,53



Obr. č. 5: Kalibrační křivka vytvořena v programu LightCycler 480 dle známé koncentrace bakterií.

2.7 Příprava sekvenační knihovny

Identifikace bakterií, které se nacházely v jednotlivých sliznicích myši domácí, probíhala na základě sekvenace DNA ve variabilní oblasti V3-V4 genu pro 16S rRNA. Pro tento účel nebyly však použity všechny vzorky, jako tomu bylo u kvantifikace bakterií v předchozí podkapitole. Vzorky izolované DNA pocházející z nosní sliznice, slin, moči a trusu byly vybrány, pokud možno, vždy od stejných sedmi samců a sedmi samic v závislosti na výsledcích bakteriální abundance. Vzorky izolované DNA z vaginální sliznice naopak pocházely od všech deseti samic. Od každé samice byly vybrány tři vzorky zahrnující různé fáze estrálního cyklu. Příprava sekvenačních knihoven probíhala za použití tzv. dvoukrokové PCR (PCR 1 a PCR 2) a následně byl výsledný produkt kvantifikován pomocí elektroforézy. Tento postup byl pro každý vzorek proveden dvakrát pro ověření konzistence výsledku a pro kontrolu případné stochasticity během PCR kroku.

V PCR 1 byla reakční směs tvořena 5 μ l KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Elisabeth Pharmacon), který obsahoval KAPA HiFi HotStart DNA polymerázu, směs

dNTP, reakční pufr a MgCl₂. Do reakce bylo dále přidáno 0,2 µl forward primeru (10 µM), 0,2 µl reverse primeru (10 µM) a 4,6 µl DNA od vzorků vybraných sliznic myši domácí. Použity byly stejné primery jako při qPCR:

S-D-Bact-0343-a-S-15: 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'

S-D-Bact-0785-a-A-21: 5'-ACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Tyto primery navíc obsahovaly krátké koncové sekvence kompatibilní se sekvenačními adaptory. Ty umožnily jejich propojení v druhém kole PCR. Do PCR byly taktéž zařazeny negativní kontroly z izolace DNA, negativní kontrola PCR s 4,6 µl sterilní vody namísto templátu a také dvě pozitivní kontroly. Pozitivní kontroly se skládaly z 0,5 µl DNA izolované z bakteriální kultury (ZymoBIOMICS Microbial Community Standard) a 4,1 µl sterilní vody. Postup při přípravě reakční směsi byl shodný jako při qPCR. Reakce probíhala na PCR termocykleru s následujícími podmínkami: počáteční denaturace byla nastavena na 95 °C/3 min, poté následovalo 28 cyklů sestávajících z denaturace 95 °C/30 s, annealingu 55 °C/30 s a extenze 72 °C/30 s a poslední krok, tedy finální extenze, probíhal při 72 °C/5 min.

Reakční směs v PCR 2 byla tvořena 10 µl KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 2 µl forward a 2 µl reverse Nextera sekvenačních adaptorů a 6 µl produktu z PCR 1. Sekvenační adaptory obsahovaly rovněž krátké sekvence - indexy, které byly specifické pro každý vzorek DNA. Umožňovaly tak jeho přesnou identifikaci ve velkém množství sekvenovaných vzorků. Reakce probíhala na PCR termocykleru se stejnými podmínkami jako při PCR 1 s tím rozdílem, že byl snížen počet cyklů na 12.

Pro kvantifikaci produktů z PCR 2 byl připraven 1,5% agarózový gel. Ten byl složen ze 70 ml TBE pufru (0,5x), 1,05 g agarózy a 3,5 µl barviva GoldView. Nejprve bylo v kádince smícháno TBE s agarózou. Kádinka s touto směsí byla následně vložena do mikrovlnné trouby, kde se agaróza rozpustila a byl tak vytvořen čirý roztok. K němu bylo poté přidáno barvivo GoldView, které se váže na DNA a tím ji vizualizuje pod UV světlem. V konečné fázi byl roztok nalit do vaničky s umístěnými hřebeny. Po zatuhnutí gelu byly hřebeny vyndány a vanička byla přenesena do elektroforetické vany, kde byl gel přelit TBE puforem. V destičce byly smíchány 4 µl produktu z PCR 2 a 1 µl barviva (tzv. loading dye), které obsahuje glycerol, díky němuž vzorky klesnou až na dno jamek. Tyto vzorky spolu s 4 µl žebříku byly následně přidány do vytvořených jamek v gelu. Elektroforéza byla spuštěna na 40 minut při 100 V.

K následné kvantifikaci PCR produktů byl použit program GenoSoft. Jednotlivé vzorky byly dle naměřené koncentrace DNA rozděleny do čtyř kategorií. Veškeré vzorky,

kromě negativních kontrol, které měly koncentraci v obou duplikátech nižší než 10 ng/μl byly vyřazeny. Vzorky patřící do shodné kategorie byly přeneseny do společné mikrozkuhavky, kde od každého z nich bylo přidáno 8 μl. Od kontrol s koncentrací pod 10ng/μl bylo odebráno 12 μl. Tyto směsné vzorky byly následně přečištěny na kuličkách Agentcourt AMPure XP (Beckman Coulter). Dle protokolu od výrobce bylo z každého směsného vzorku přeneseno 30 μl na přístroj Pippin prep (Sage Science), kde byla vyřezána cílová oblast DNA - 450-700 bází. Na základě počtu jednotlivých vzorků a jejich naměřené koncentrace dle Qubit fluorometru ve směsných vzorcích, byl vytvořen jeden finální vzorek. Ten byl k samotné sekvenaci DNA probíhající pomocí Illumina MiSeq (v3 kit, 300 bp paired end reads - sekvenování z obou konců fragmentu DNA) převezen do společnosti CEITEC (Central European Institute of Technology, Brno).

2.8 Bioinformatické analýzy

Sekvenování DNA probíhalo na platformě Illumina MiSeq. Sekvenační data byla k dalšímu zpracování produkována ve formátu FASTQ. K odstranění nežádoucích adaptorových sekvencí a sekvencí primerů byl použit program Skewer (Jiang et al., 2014). Odstraněny byly taktéž nekvalitní sekvence. Pomocí programu DADA2 (Callahan et al., 2016) byly opraveny sekvenační chyby (tzv. denoising). K detekci a následnému odstranění chimérických haplotypů, které jsou často produkovány během PCR, byl použit program UCHIME spolu s referenční databází gold.fna (Edgar et al., 2011). Eliminovány byly také haplotypy, jejichž relativní četnost v jakémkoliv negativním kontrolním vzorku představovala více než 2 % sekvencí. V konečné databázi byly ponechány pouze takové haplotypy, které byly u daného vzorku konzistentně detekovány v obou duplikátech. Tím byla co nejvíce eliminována přítomnost artefaktů, které nebyly odstraněny v předchozích krocích. Taxonomické zařazení haplotypů bylo provedeno pomocí RDP classifier (s 80% posteriorní konfidenční pravděpodobností) (Wang et al., 2007) s využitím SILVA referenční databáze. Sekvence těchto haplotypů byly zalignovány v programu PyNAST (Caporaso et al., 2010) a v programu fastfree byl vytvořen jejich fylogenetický strom. Metadata k jednotlivým vzorkům, abundanční matice (počty sekvencí pro jednotlivé haplotypy v jednotlivých vzorcích), sekvence haplotypů s jejich taxonomickým zařazením a fylogenetickým stromem byly sloučeny do jedné databáze pomocí balíčku phyloseq. Tato databáze byla použita pro následné statistické analýzy. Pro konzistenci s obecně přijímanou terminologií, budou haplotypy v dalším textu nazývány jako OTU.

Avšak na rozdíl od většiny publikací nebyly OTU definovány na základě sekvenční podobnosti vstupních dat, ale jejich identifikace probíhala, jak bylo popsáno výše, za použití algoritmů, které mají větší biologickou relevanci.

2.8 Statistické analýzy

Veškeré následující statistické analýzy probíhaly pomocí programu R. Zvolená hladina významnosti u všech testů: $P = 0.05$. K testování rozdílů v bakteriální abundanci mezi zkoumanými sliznicemi a také mezi jednotlivými fázemi estrálního cyklu byl použit test ANOVA. Odhalení konkrétních rozdílů probíhalo za pomoci Tukeyova post-hoc testu (95% konfidenční interval). Mikrobiální alfa diverzita byla detekována u jednotlivých sliznic myši domácí a také ve vagině v průběhu třech fází estrálního cyklu (fáze diestrus byla vyřazena, protože vzorků této fáze nebylo dostatečné množství pro statistickou analýzu). Obecně je alfa diverzitou vyjadřována rozmanitost druhů na lokální úrovni. Zde konkrétně představuje rozmanitost bakteriálních OTU v dané sliznici. Měřena byla pomocí dvou ukazatelů: Chao1 a Shannonova indexu (Chao, 1984; Shannon, 1948). Ty se od sebe odlišují v tom, jakým parametrem diverzity se zabývají. Chao1 index odhaduje celkový počet druhů ve vzorku na základě frekvence singletonů (sekvence OTU, které byly detekovány pouze jednou) a doubletonů (sekvence OTU, které byly detekovány dvakrát), tedy vzácných OTU. Shannonův index bere v potaz jak bohatost OTU, tak i jejich relativní zastoupení neboli jejich vyrovnanost (z angl. eveness) v daném prostředí. Pro dosažení normální distribuce reziduálů byly hodnoty Chao1 před statistickými analýzami logaritmovány. K finálnímu statistickému zhodnocení rozdílů v alfa diverzitě byly použity lineární smíšené modely a následně Tukeyův post-hoc test (95% konfidenční pravděpodobnost).

Ke kvantifikaci rozdílů ve skladbě mikrobioty mezi všemi zkoumanými sliznicemi a také mezi třemi fázemi estrálního cyklu ve vaginální sliznici byl použit Bray-Curtisův index nepodobnosti a vážená UniFrac (Unique Fraction) vzdálenostní metrika. Analýza pomocí UniFrac vzdálenostní metriky zohledňuje i fylogenetickou příbuznost mezi detekovanými OTU, kdy rozdíly v abundancích blízké příbuzných OTU mají nižší váhu. Vybrána byla její vážená verze, která oproti nevážené verzi zahrnuje i relativní abundance OTU. Finální statistické zhodnocení probíhalo pomocí testu PERMANOVA. Pro zobrazení odlišností ve skladbě mikrobioty mezi zkoumanými sliznicemi byla provedena také metoda nemetrického mnohorozměrného škálování (NMDS, z angl. Non-metric

multidimensional scaling) s využitím Bray-Curtisova indexu nepodobnosti. Taktéž byly sestaveny hierarchické klastrovací mapy pro dominantní bakteriální rody v jednotlivých sliznicích a také pro dominantní bakteriální rody nacházející se ve vaginální sliznici. K hierarchickému klastrování řádek a sloupců byla použita Wardova metoda.

K detekci konkrétních OTU, které způsobovaly změny ve skladbě mikrobioty během estrálního cyklu byly použity Bayesovské modely distribuce druhů (tzv. Bayesian joint species distribution models) pro data s negativní binominální distribucí z R balíčku `boral` (Tikhonov et al., 2017). Fáze estrálního cyklu byla vložena jako faktoriální proměnná, identita jedince jako náhodný efekt a logaritmovaný počet sekvencí na vzorek jako offset modelu, který předpokládá, že pozorované počty sekvencí pro jednotlivé bakterie jsou přímo úměrné sekvenační hloubce. Parametry modelu byly odhaleny na základě Markov Chain Monte Carlo simulace, která měla 40 000 kroků, přičemž prvních 500 nebylo zohledněno (tzv. burnin) a z důvodu autokorelace se do výsledku započítával pouze každý čtvrtý krok.

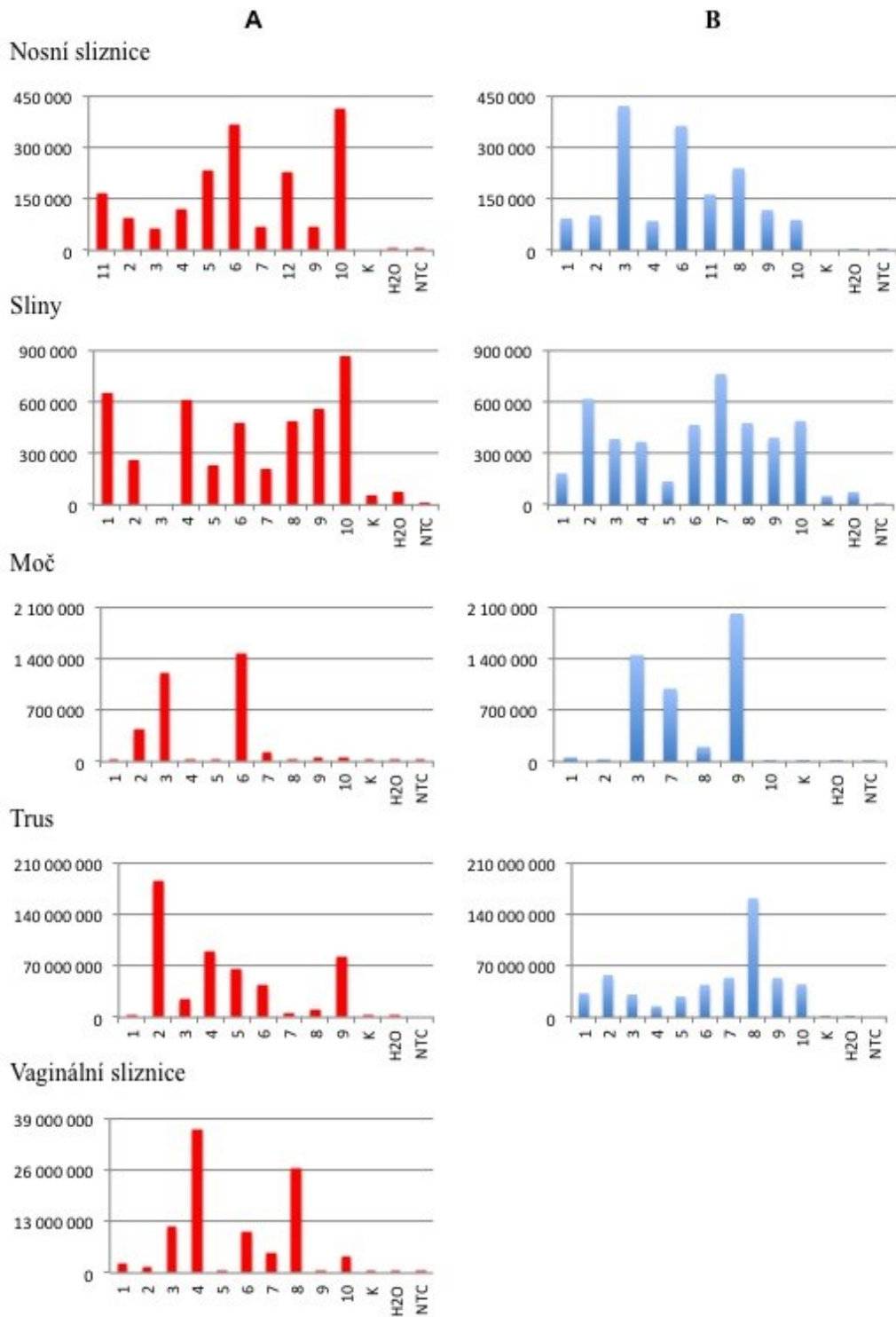
Korelace ve složení mikrobioty mezi sliznicemi v rámci jednotlivých myší byla zkoumána pomocí Mantelova testu. Pro detekci vlivu pohlaví na bakteriální abundanci ve zkoumaných sliznicích byl použit test ANOVA. Vliv pohlaví na bakteriální diverzitu byl zkoumán pomocí smíšených lineárních modelů. Testování vlivu pohlaví na taxonomické složení bakterií probíhalo analýzou PERMANOVA.

3 Výsledky

3.1 Kvantifikace bakterií ve sliznicích myši domácí

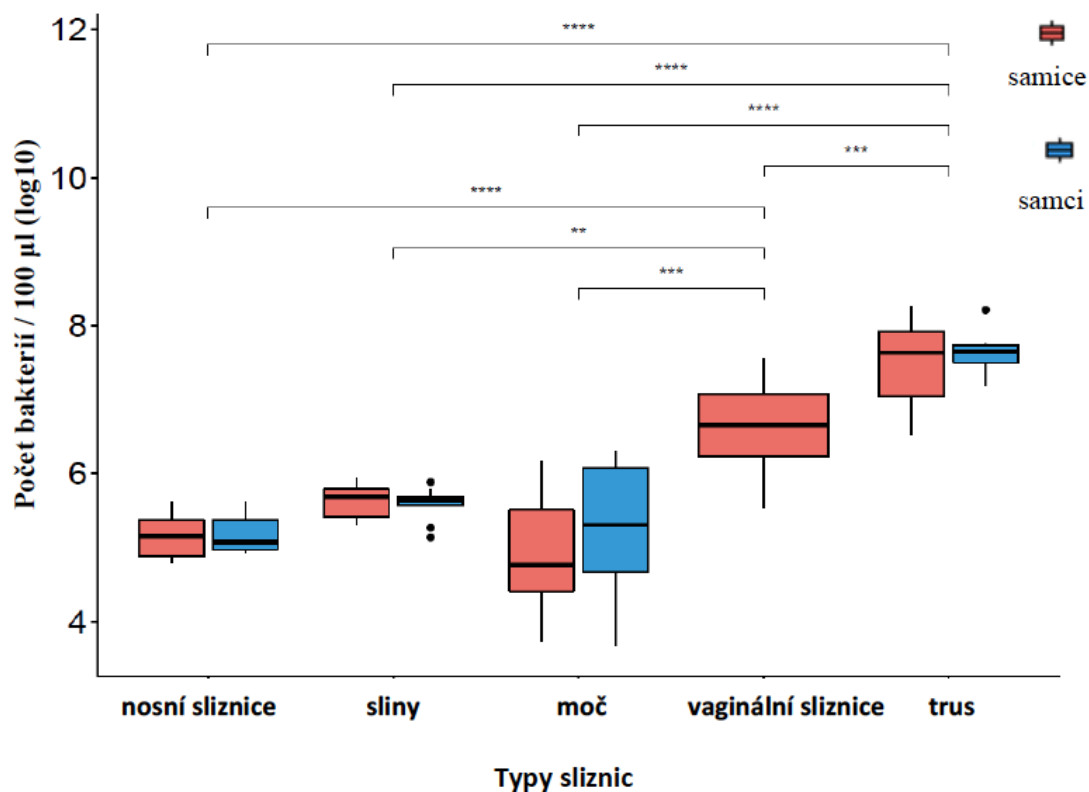
Pomocí metody qPCR byly u samců a samic myši domácí kvantifikovány bakterie, které se vyskytovaly v nosní sliznici ve slinách, v moči, ve vaginální sliznici a v trusu. Bylo zjištěno, v jakém rozmezí se pohybují bakteriální abundance u zkoumaných sliznic a jaká je interindividuální variabilita v množství bakterií v rámci těchto jednotlivých sliznic. Dále byly mezi sliznicemi odhaleny signifikantní rozdíly v počtu bakterií a bylo detekováno, kde se bakterií nachází nejméně a naopak nejvíce. Bakterie se podařilo, kromě vzorku slin jedné ze samic (vzorek č. 3), kvantifikovat ve všech vzorcích. Použití kontrolních vzorků potvrdilo, že výsledky skutečně odrážejí počet bakterií, který se nachází ve zkoumaných částech těla myši.

Pro zobrazení počtu bakterií v jednotlivých sliznicích byl jejich počet nejprve vztažen ke stejnému objemu 100 μ l a následně byly pro každou skupinu vzorků vytvořeny dva sloupcové grafy - jeden pro samce a druhý pro samice (Obr. č. 6). Výsledky ukázaly, že v nosní sliznici se nacházelo řádově od 10^4 do 10^5 bakterií. Výplachy ústní dutiny obsahovaly řádově 10^5 bakterií. V moči se vyskytovalo řádově od 10^3 do 10^6 bakterií. Pro kvantifikaci bakterií ze 160 mg trusu byl počet bakterií vztažen k objemu vody, ve kterém byl trus extrahován. Výsledné množství bakterií se pohybovalo řádově od 10^6 do 10^8 bakterií. Graf pro kvantifikaci bakterií ve výplachu vaginální sliznice zobrazuje u každé samice průměrnou hodnotu bakteriální abundance pocházející celkem z pěti odběrů. V průměru bylo tedy detekováno řádově od 10^5 do 10^7 bakterií (detailní výsledky kvantifikace bakterií ve vagině v průběhu estrálního cyklu obsahuje kapitola 3.3). Z grafů je zřejmé, že mezi jednotlivými myšmi se v rámci stejného typu sliznice objevovala interindividuální variabilita v počtu bakterií. Vzorky moči jsou jedním z míst, kde byla tato variabilita nejvyšší. Naopak nejmenší variabilita se nacházela v nosní sliznici či slinách.



Obr. č. 6: Počet bakterií v jednotlivých sliznicích u samic (A) a samců (B) myši domácí. Na ose x je vždy uvedeno označení pro jednotlivé myši a osa y zobrazuje počet bakterií v přepočtu na objem 100 µl. Grafy také zahrnují výsledky kvantifikace bakterií v kontrolních vzorcích: kontrola kitu pro izolaci DNA (K), kontrola vody (H₂O) a kontrola komponentů použitých v qPCR (NTC).

Pro testování rozdílů v bakteriální abundanci mezi zkoumanými sliznicemi byly použity logaritmované hodnoty počtu bakterií (\log_{10}) vztažených ke shodnému objemu 100 μl (Obr. č. 7). Signifikantní rozdíly mezi sliznicemi prokázal test ANOVA ($df = 4$, $F = 71.08$, $P = 2e-16$). Tukeyův post-hoc test (95% konfidenční interval) následně odhalil významné rozdíly mezi trusem a ostatními typy vzorků ($P < 0.000001$) a také mezi výplachy vaginální sliznice a ostatními typy vzorků ($P < 0.0002$). Mezi dalšími typy vzorků - nosní sliznicí a slinami nebyl rozdíl průkazný ($P = 0.09$). Naopak ve slinách bylo detekováno více bakterií než v moči ($P = 0.027$). Nejvíce bakterií tedy obsahoval trus, za ním následovaly vzorky výplachů vaginální sliznice.



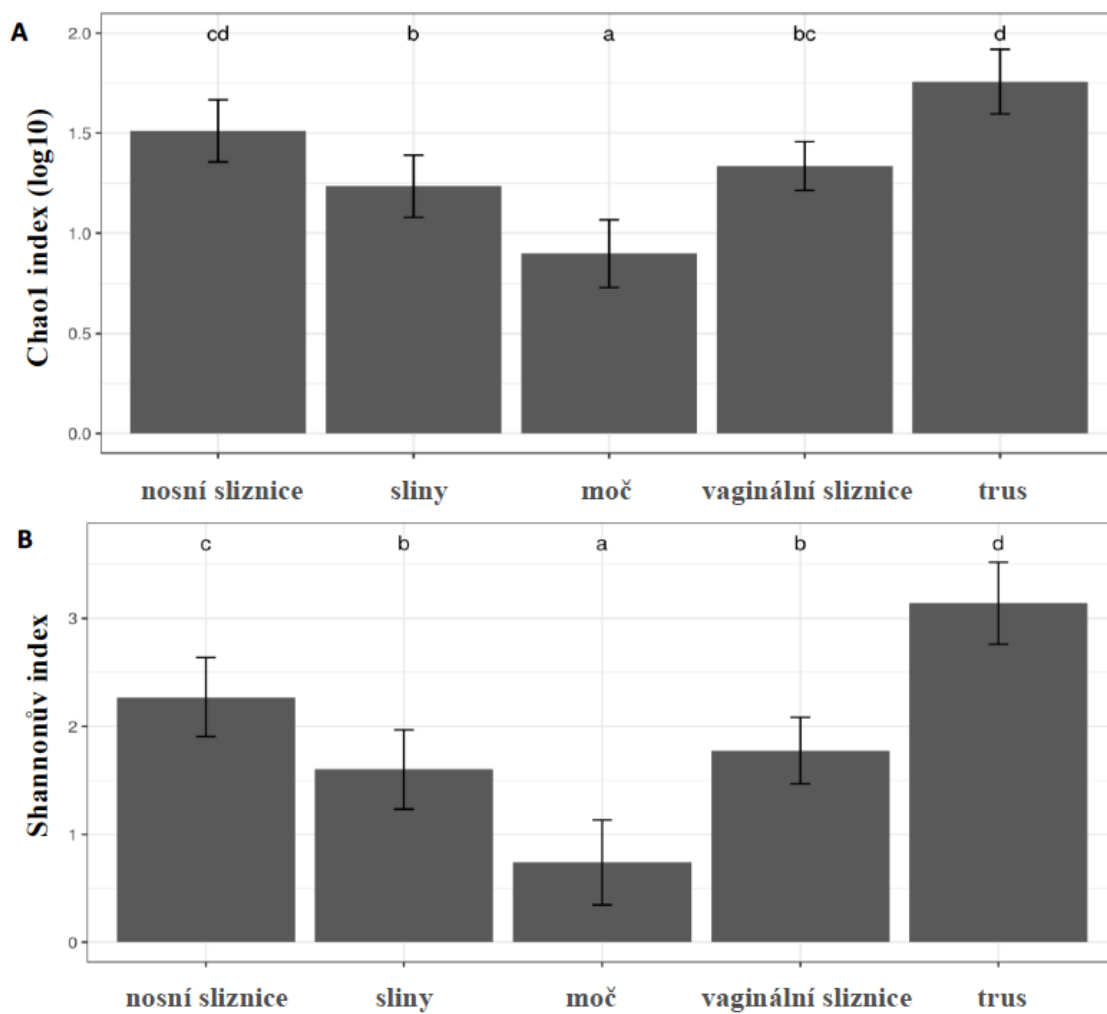
Obr. č. 7: Porovnání počtu bakterií mezi sliznicemi myši domácí. Symboly hvězdiček označují dosaženou hladinu významnosti v Tukeyově post-hoc testu vždy pro dvě zkoumané sliznice, které jsou spojeny úsečkou: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

3.2 Bakteriální diverzita ve sliznicích myši domácí

Další experimentální část byla zaměřena na bakteriální diverzitu jednotlivých sliznic. Ta zahrnovala měření alfa diverzity a detekci konkrétních bakteriálních taxonů, které se ve sliznicích vyskytovaly. Jednotlivé kroky zahrnovaly přípravu sekvenační knihovny, sekvenaci oblasti genu 16S rRNA a analýzu sekvenačních dat. Výsledná sekvenační databáze obsahovala celkem 1050 bakteriálních OTU, které byly reprezentovány 446 218 sekvencemi. S pomocí RDP classifier byly OTU dále zařazeny do příslušných taxonomických kategorií.

3.2.1 Statistické zhodnocení bakteriální alfa diverzity

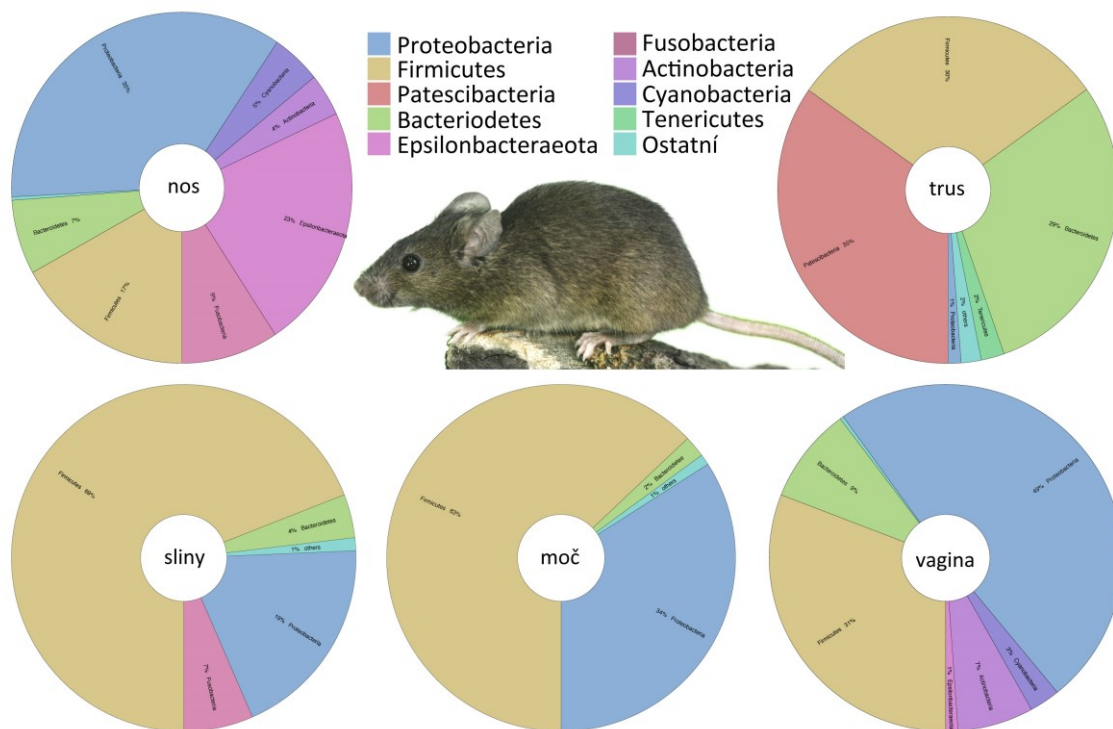
Alfa diverzita byla u jednotlivých sliznic měřena pomocí Chao1 a Shannonova indexu (Obr. č. 8). Rozdíly v diverzitě mezi sliznicemi byly testovány pomocí lineárních smíšených modelů a následně Tukeyovým post-hoc testem. Výsledky prokázaly, že mikrobiální diverzita se mezi zkoumanými sliznicemi signifikantně odlišovala. Dle Chao1 i Shannonova indexu byla nejvyšší diverzita obsažena v trusu, naopak místo s nejnižší diverzitou představovala moč (pro Shannonův index: $df = 4$, $\chi^2 = 65.116$, $P < 0.001$, pro Chao1 index: $df = 4$, $\chi^2 = 44.988$, $P < 0.0001$). Při použití Shannonova indexu byla druhým nejdíverzifikovanějším místem nosní sliznice a poté následovaly sliny spolu s vaginální sliznicí, jejichž diverzita byla na podobné úrovni. Diverzita u těchto třech posledních míst vykazovala srovnatelné výsledky i s použitím Chao1 indexu.



Obr. č. 8: Porovnání bakteriální alfa diverzity mezi jednotlivými sliznicemi dle Chao1 (A) a Shannonova indexu (B). Výšky sloupců odpovídají predikovaným průměrům pro jednotlivé skupiny a chybové úsečky 95% konfidenčním intervalům. Odlišná písmena uvedena nad jednotlivými sloupci označují signifikantní rozdíly alfa diverzity mezi sliznicemi dle Tukeyova post-hoc testu.

3.2.2 Detailní zastoupení jednotlivých bakteriálních taxonů

Detekované bakterie se v rámci všech zkoumaných sliznic řadily nejčastěji do jednoho z těchto devíti uvedených kmenů: Proteobacteria, Firmicutes, Patescibacteria, Bacteroidetes, Epsilonbacteraeota, Fusobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria a Tenericutes (Obr. č. 9). Zbylé kmeny patřily do kategorie Ostatní a tvořily nízkou část mikrobiální populace. Sliznice se mezi sebou lišily jak v počtu těchto hlavních bakteriálních kmenů, tak i v jejich skladbě. Nejvíce kmenů se nacházelo v nosní a vaginální sliznici, nejméně pak v moči. Firmicutes a Proteobacteria byly kmeny, které ve většině sliznic tvořily dominantní část bakterií. Naopak v nosní sliznici bylo rozložení přítomných kmenů více rovnoměrné a v trusu převažoval výskyt kmene Patescibacteria.



Obr. č. 9: Grafické znázornění pro zastoupení bakteriálních kmenů v jednotlivých sliznicích. Zobrazeno je procentuální zastoupení celkem devíti bakteriálních kmenů s abundancí > 1 %. Kmeny s nižší abundancí zahrnuje skupina Ostatní.

Sliznice se lišily skladbou bakteriálních kmenů a taktéž mikrobiotou na nižších taxonomických úrovních. Detailní zastoupení bakterií na úrovni kmenů, tříd, čeledí a rodů pro každý typ sliznice je uvedeno v Tab. č. 2 - 6. V nosní sliznici byly detekovány zejména bakterie z kmenů Proteobacteria, Epsilonbacteraeota a Firmicutes. Zatímco kmen Epsilonbacteraeota zde představoval druhý nejhojnější kmen, v ostatních sliznicích dosahoval maximálně 1 %. Mezi nejvíce abundantní bakteriální třídy patřily Gammaproteobacteria, Campylobacteria a Bacilli. Nejvíce dominantními rody byly *Campylobacter* a *Pseudomonas*.

Ve slinách, moči a vaginální sliznici se vyskytovaly především bakterie pocházející ze dvou kmenů: Firmicutes a Proteobacteria. Ve slinách výrazně dominoval kmen Firmicutes, do kterého se řadilo 69 % všech bakterií. Firmicutes byl nejvíce abundantním kmenem také v moči a spolu s kmenem Proteobacteria tvořily 97 % všech bakterií. Ve vaginální sliznici byl naopak nejhojnějším kmenem Proteobacteria s 49% abundancí. U všech těchto typů sliznic patřily mezi nejvíce abundantní třídy Bacilli a Gammaproteobacteria. Zatímco ve slinách a v moči byl rodem s nejvyšším procentuálním zastoupením *Streptococcus*, který v obou sliznicích tvořil přes polovinu mikrobiální populace, ve vaginální sliznici jím byl rod *Rodentibacter*.

Bakterie v trusu pocházely zejména z kmenů Patescibacteria, Firmicutes a Bacteroidetes. Zastoupení těchto kmenů bylo téměř vyrovnané, každý měl abundanci kolem 30 %. V ostatních sliznicích se kmen Patescibacteria téměř nevyskytoval a také kmen Bacteroidetes dosahoval v jiných sliznicích abundance maximálně 9 %. Naopak kmen Proteobacteria, který byl v ostatních sliznicích relativně hojný, zde zahrnoval pouze 1 % bakterií. Nejhojnější bakteriální třídy představovaly Saccharimonadia, Clostridia a Bacteroidia. Bakterie z třídy Clostridia měly v ostatních sliznicích nižší procentuální zastoupení než další třída z kmene Firmicutes - Bacilli, avšak v trusu tomu bylo naopak a bakterie z třídy Bacilli se zde vyskytovaly pouze v zanedbatelném množství. K nejvíce abundantnímu rodu v trusu patřil překvapivě *Candidatus_Saccharimonas* z kmene Patescibacteria.

Tab. č. 2: Nosní sliznice – zastoupení bakteriálních taxonů.

KMEN	TŘÍDA	ČELEĎ	ROD
Proteobacteria 35 %	Gammaproteobacteria 34 %	Pseudomonadaceae 20 %	<i>Pseudomonas</i> 20 %
		Enterobacteriaceae 4 %	<i>Pantoea</i> 3 % <i>Serratia</i> 1 %
		Pasteurellaceae 4 %	<i>Muribacter</i> 2 % <i>Rodentibacter</i> 2 %
		Moraxellaceae 3 %	<i>Acinetobacter</i> 3%
		Burkholderiaceae 1 %	<i>Undibacterium</i> 1 %
		Halomonadaceae 1 %	<i>Halomonas</i> 1 %
Epsilonbacteraeota 23 %	Campylobacteria 23 %	Campylobacteraceae 21 %	<i>Campylobacter</i> 21 %
		Helicobacteraceae 2 %	<i>Helicobacter</i> 2 %
Firmicutes 17 %	Bacilli 15 %	Streptococcaceae 11 %	<i>Streptococcus</i> 11 %
		Lactobacillaceae 2 %	<i>Lactobacillus</i> 2 %
	Clostridia 2 %	Lachnospiraceae 2 %	
Fusobacteria 9 %	Fusobacteriia 9 %	Leptotrichiaceae 9 %	
Bacteroidetes 7 %	Bacteroidia 7 %	Weeksellaceae 5 %	<i>Bergeyella</i> 5 %
		Muribaculaceae 1 %	
Cyanobacteria 5 %	Oxyphotobacteria 5 %		
Actinobacteria 4 %	Actinobacteria 4 %	Propionibacteriaceae 2 %	<i>Cutibacterium</i> 2 %

Tab. č. 3: Sliny – zastoupení bakteriálních taxonů.

KMEN	TŘÍDA	ČELEĎ	ROD
Firmicutes 69 %	Bacilli 69 %	Streptococcaceae 54 %	<i>Streptococcus</i> 54 %
		Family_XI 14 %	<i>Gemella</i> 14 %
Proteobacteria 19 %	Gammaproteobacteria 19 %	Pasteurellaceae 18 %	<i>Muribacter</i> 15 % <i>Rodentibacter</i> 2 %
		Moraxellaceae 1 %	<i>Acinetobacter</i> 1 %
Fusobacteria 7 %	Fusobacteriia 7 %	Leptotrichiaceae 7 %	<i>Leptotrichia</i> 7 %
Bacteroidetes 4 %	Bacteroidia 4 %		

Tab. č. 4: Moč – zastoupení bakteriálních taxonů.

KMEN	TŘÍDA	ČELEĎ	ROD
Firmicutes 63 %	Bacilli 60 %	Streptococcaceae 52 %	<i>Streptococcus</i> 52 %
		Lactobacillaceae 6 %	<i>Lactobacillus</i> 6%
	Clostridia 3 %	Lachnospiraceae 2 %	
		Ruminococcaceae 1 %	
Proteobacteria 34 %	Gammaproteobacteria 32 %	Moraxellaceae 19 %	<i>Acinetobacter</i> 19 %
		Pasteurellaceae 11 %	<i>Muribacter</i> 9 %
		Pseudomonadaceae 2 %	<i>Pseudomonas</i> 2 %
	Deltaproteobacteria 2 %	Desulfovibrionaceae 2 %	
Bacteroidetes 2 %	Bacteroidia 2 %	Rikenellaceae 1 %	

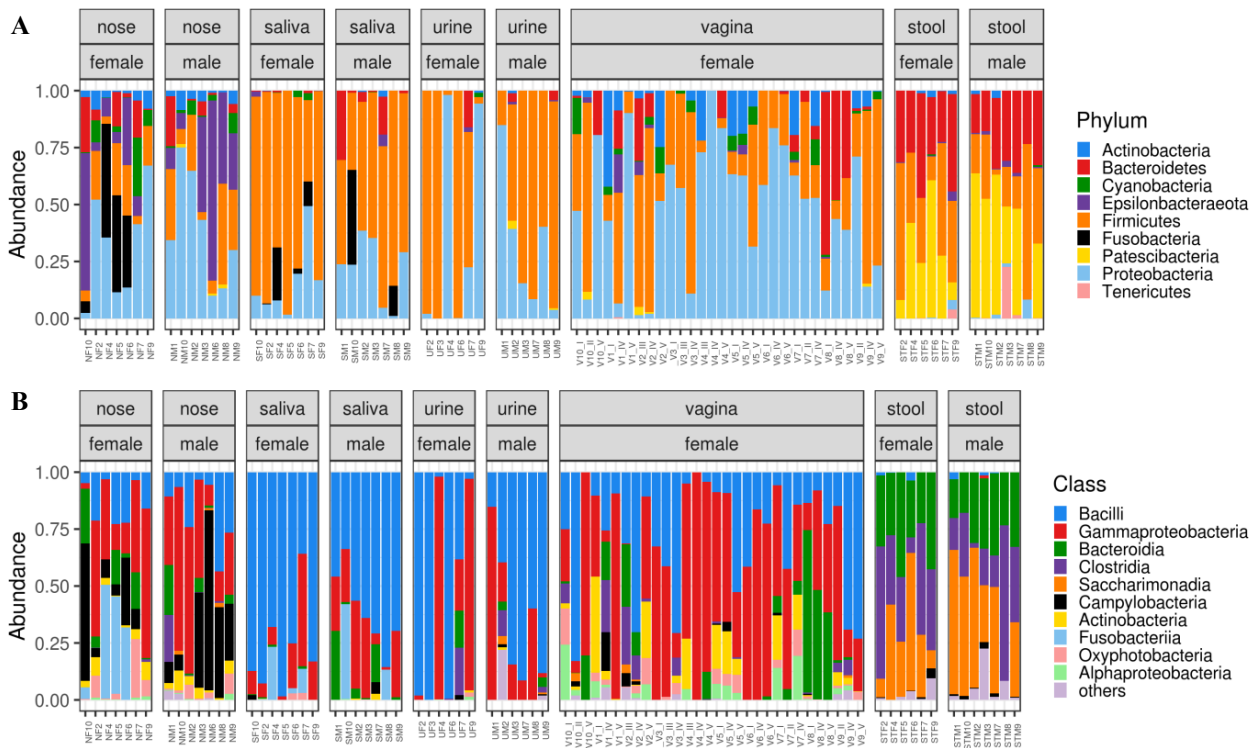
Tab. č. 5: Vaginální sliznice – zastoupení bakteriálních taxonů.

KMEN	TŘÍDA	ČELEĎ	ROD
Proteobacteria 49 %	Gammaproteobacteria 45 %	Pasteurellaceae 33 %	<i>Rodentibacter</i> 22 % <i>Muribacter</i> 10 %
		Pseudomonadaceae 5 %	<i>Pseudomonas</i> 5 %
		Enterobacteriaceae 4 %	<i>Serratia</i> 3 %
	Alphaproteobacteria 3 %	Sphingomonadaceae 1 %	
Firmicutes 31 %	Bacilli 28 %	Lactobacillaceae 16 %	<i>Lactobacillus</i> 16 %
		Streptococcaceae 4 %	<i>Streptococcus</i> 3 % Lactococcus 1 %
		Family_XI 2 %	<i>Gemella</i> 2 %
		Enterococcaceae 1 %	<i>Enterococcus</i> 1 %
		Carnobacteriaceae 1 %	
Clostridia 3 %	Lachnospiraceae 3 %		
	Bacteroidetes 9 %	Bacteroidia 9 %	Muribaculaceae 1 % Weeksellaceae 1 % <i>Bergeyella</i> 1 %
Actinobacteria 7 %	Actinobacteria 6 %	Propionibacteriaceae 4 %	<i>Cutibacterium</i> 4 %
		Bifidobacteriaceae 1 %	<i>Bifidobacterium</i> 1 %
		Micrococcaceae 1 %	
Cyanobacteria 3 %	Oxyphotobacteria 3 %		
Epsilonbacteraeota 1 %	Campylobacteria 1 %	Helicobacteraceae 1 %	<i>Helicobacter</i> 1 %

Tab. č. 6: Trus – zastoupení bakteriálních taxonů.

KMEN	TŘÍDA	ČELEĎ	ROD
Patescibacteria 35 %	Saccharimonadia 35 %	Saccharimonadaceae 35 %	<i>Candidatus_Saccharimonas</i> 35 %
Firmicutes 30 %	Clostridia 30 %	Lachnospiraceae 19 %	<i>Lachnoclostridium</i> 3 %
		Ruminococcaceae 10 %	
Bacteroidetes 29 %	Bacteroidia 29 %	Muribaculaceae 13 %	
		Rikenellaceae 6 %	<i>Alistipes</i> 2 % <i>Rikenella</i> 1 %
		Bacteroidaceae 4 %	<i>Bacteroides</i> 4 %
		Prevotellaceae 3 %	
		Marinifilaceae 2 %	<i>Odoribacter</i> 2 %
Tenericutes 2 %	Mollucites 2 %	Mycoplasmataceae 2 %	<i>Mycoplasma</i> 2 %
Proteobacteria 1 %	Deltaproteobacteria 1 %	Desulfovibrionaceae 1 %	

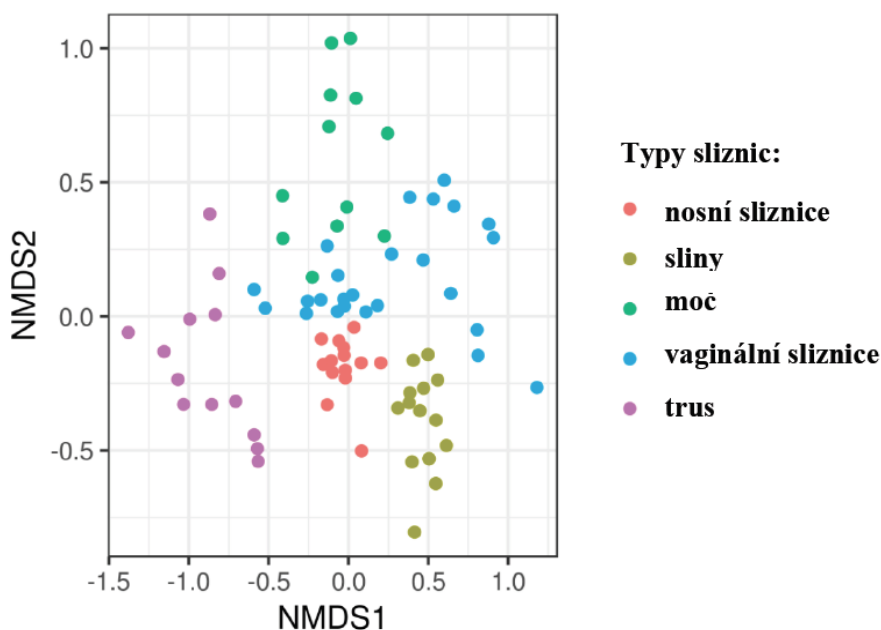
Určitá variabilita bakteriálních taxonů se nacházela i mezi jednotlivými myši (Obr. č. 10). Některé detekované třídy se vyskytovaly specificky pouze v určité sliznici. Byly jimi například Saccharimonadia z kmene Patescibacteria v trusu či Camylobacteria z kmene Epsilonbacteraeota v nosní sliznici. V ostatních typech vzorků se tyto třídy nacházely pouze u několika málo jedinců a to ve velmi nízkých abundancích.



Obr. č. 10: Relativní abundance bakteriálních kmenů (A) a tříd (B) u jednotlivých myši. Obrázek znázorňuje abundanci taxonů v nosní sliznici, slin, moči, vaginální sliznici a trusu, vždy pro jednotlivé samice a samce.

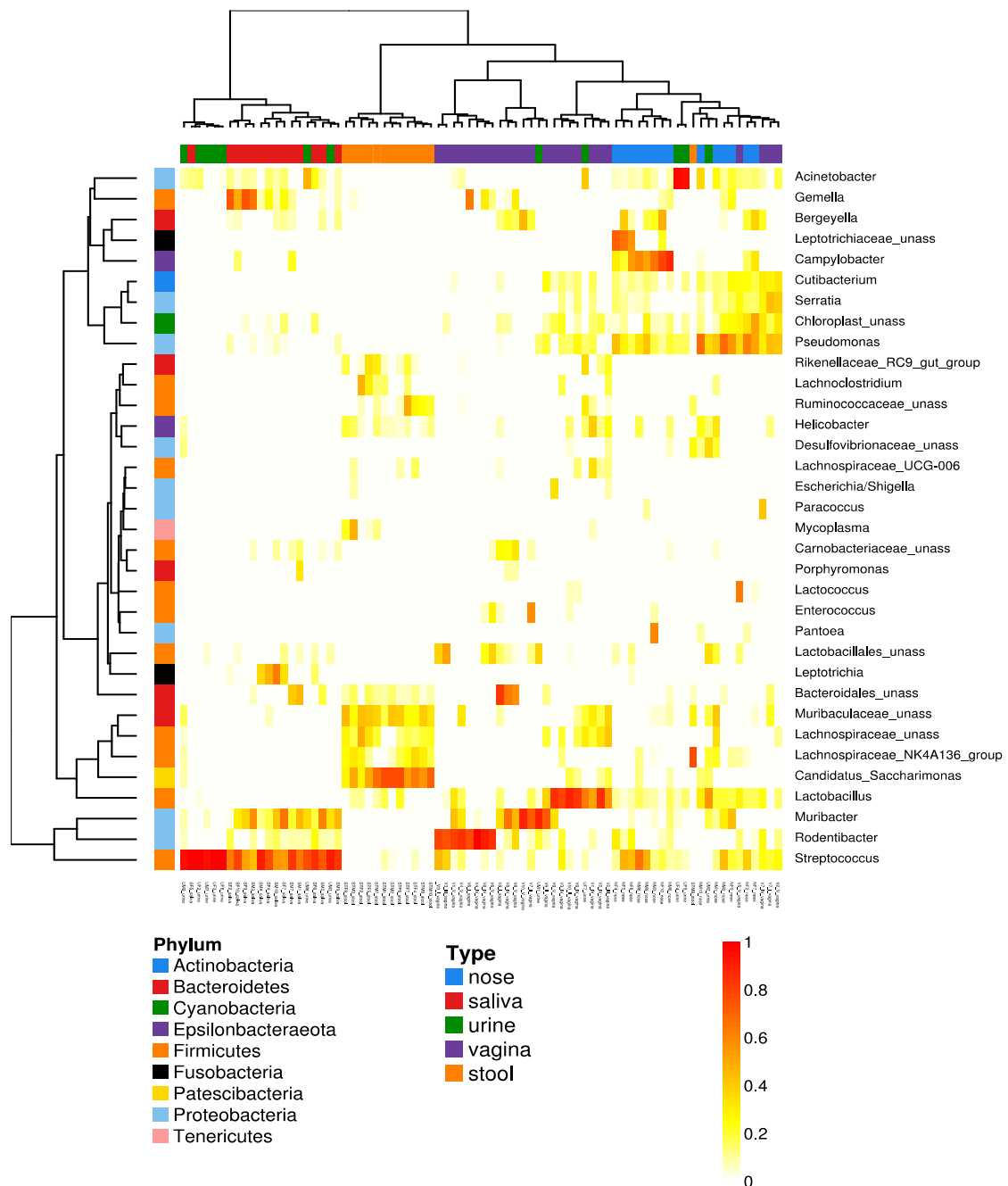
3.2.3 Porovnání mikrobiálního složení mezi sliznicemi

Ke kvantifikaci rozdílů ve složení mikrobioty mezi různými typy sliznic byl použit Bray-Curtisův index nepodobnosti a vážená UniFrac vzdálenostní metrika. Test PERMANOVA pro váženou UniFrac vzdálenostní metriku odhalil, že typem sliznice lze vysvětlit 54 % odlišnosti ve skladbě mikrobioty ($F(4,72) = 21.171$, $P < 0.001$). Srovnatelný výsledek (31 %) byl pozorován i v případě použití Bray-Curtisovy indexu nepodobnosti ($F(4,72) = 8.3581$, $P < 0.001$). Skladba mikrobioty se tedy mezi jednotlivými sliznicemi signifikantně lišila. Nemetrické mnohorozměrné škálování (NMDS) s využitím Bray-Curtisova indexu nepodobnosti bylo použito pro vizualizaci odlišností ve skladbě mikrobioty mezi různými sliznicemi (Obr. č. 11). Vzorky ze stejné sliznice tvořily viditelné shluky na základě podobného mikrobiálního profilu. Mikrobiota trusu se od mikrobioty ostatních sliznic nejvíce lišila. Oproti tomu, skladba mikrobioty vaginální sliznice a moči se částečně prolínala. V rámci jednotlivých myší nebyla detekována žádná korelace ve složení mikrobioty mezi sliznicemi (rozsah korelačních koeficientů v Mantelově testu = $-0.22 \sim 0.25$, ve všech případech bylo $P > 0.1$).



Obr. č. 11: Nemetrické mnohorozměrné škálování (NMDS) pro skladbu mikrobioty v jednotlivých vzorcích. Jednotlivé body znázorňují konkrétní vzorky, které byly získány buď z nosní sliznice, slin, moči, vaginální sliznice nebo trusu. Typy sliznic jsou odlišeny příslušnými barvami. Vzdálenost mezi body vyjadřuje podobnost/odlišnost mikrobiálního složení konkrétních vzorků. Čím jsou body umístěné blíže sobě, tím podobnější je složení jejich mikrobioty.

K podrobnějšímu zobrazení rozdílů na úrovni dominantních bakteriálních rodů byla použita metoda hierarchického klastrování (Obr. č. 12). Vzorky, které pocházely ze stejné sliznice, tvořily klastry z důvodu výskytu shodných dominantních rodů. Ve vzorcích z nosní sliznice byly detekovány zejména bakterie rodů *Camyplobacter*, *Pseudomonas* a *Streptococcus*. Ve slinách jimi byly především rody *Streptococcus*, *Muribacter* a *Gemella*. Rody s největší abundancí v moči byly *Streptococcus* a *Acinetobacter*. Ve vaginální sliznici byly nejhojnějšími rody *Rodentibacter*, *Lactobacillus* a *Muribacter*. A v trusu se překvapivě nejvíce vyskytoval rod *Candidatus_Saccharimonas*.

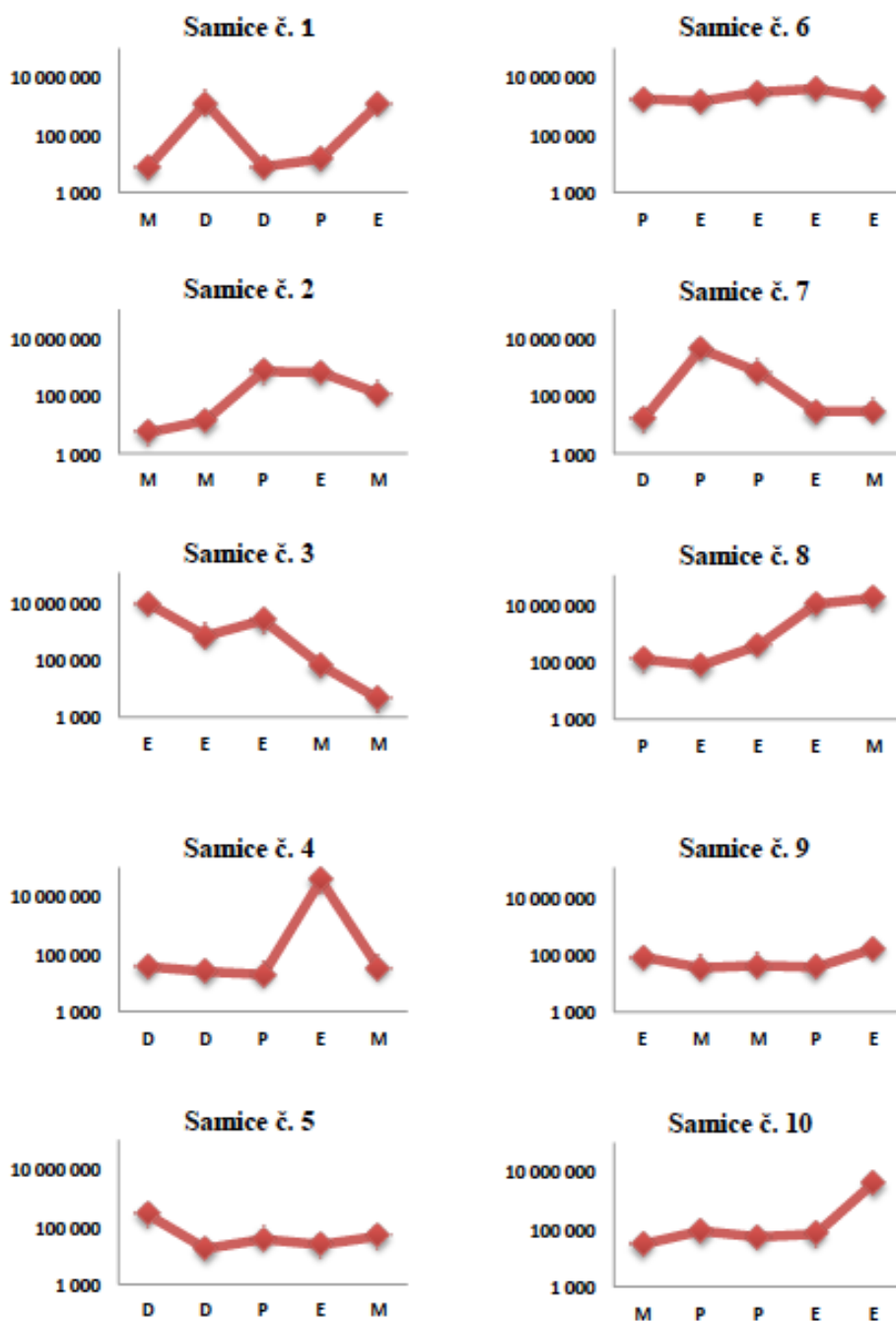


Obr. č. 12: Hierarchické klastrování dominantních bakteriálních rodů ve všech zkoumaných sliznicích. Na dolní ose x jsou uvedeny názvy vzorků získaných od jednotlivých myší. Horní osa x příslušnými barvami označuje typ sliznice. Osa y v pravé části zobrazuje bakteriální rody, které jsou v levé části příslušnými barvami zařazeny do kmenů. Rody, které v jakémkoliv vzorku představovaly < 10 % sekvenčního čtení, nebyly do analýzy zahrnuty. Barevná škála od bílé po červenou udává relativní abundanci bakteriálních rodů ve vzorcích.

3.3 Kvantitativní a kvalitativní změny mikrobioty ve vagině v průběhu estrálního cyklu myši domácí

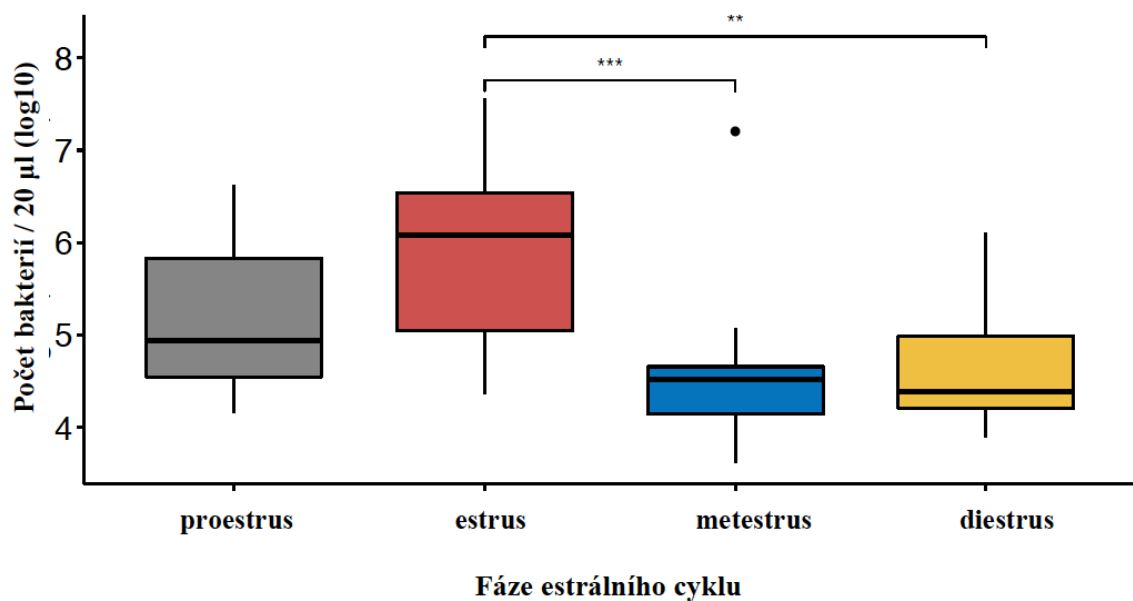
Pro kvantitativní a kvalitativní analýzu vaginální mikrobioty byly použity vzorky vaginálního výplachu od 10 samic myši domácí. Od každé samice bylo získáno celkem pět vzorků, kdy každý z nich pocházel z jednoho dne, během nichž byly odběry prováděny. Následně bylo určeno, z jaké fáze estrálního cyklu daný vzorek pochází. U kvantifikace bakterií bylo pro každou samici použito všech pět vzorků. Pro sekvenaci DNA byly použity tři vzorky od jedné samice. Kvantifikací bakterií bylo odhaleno, v jakém rozmezí se vyskytuje počet bakterií ve vaginální sliznici a jak se bakteriální abundance liší mezi jednotlivými fázemi estrálního cyklu - proestrem, estrem, metestrem a diestrem. Pomocí sekvenace DNA bylo zjištěno, jakým způsobem se v průběhu estrálního cyklu mění bakteriální alfa diverzita a zastoupení jednotlivých taxonů.

Množství bakterií ve 20 μl vaginálního výplachu se v rámci všech samic pohybovalo řádově od 10^3 do 10^7 . Z grafů je zřejmé, že během estrálního cyklu ve vagině docházelo ke změnám v bakteriální abundanci (Obr. č. 13). Tyto změny se u některých samic projevovaly jen jako mírné fluktuace, u jiných lze pozorovat velké odchylky mezi jednotlivými fázemi.



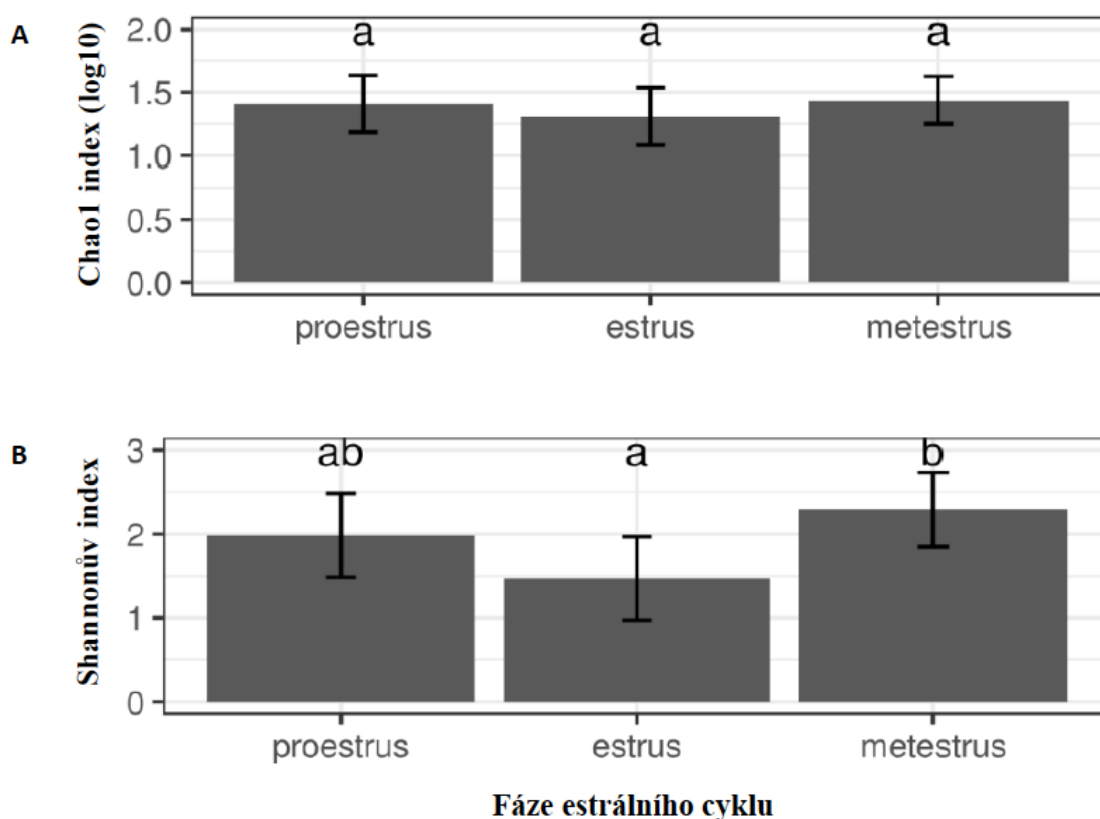
Obr. č. 13: Počet bakterií ve vaginální sliznici v průběhu estrálního cyklu u 10 samic. Kvantifikace bakterií ve vagině byla provedena celkem u 10 samic. Na ose x jsou uvedeny názvy jednotlivých fází estrálního cyklu zaznamenané během pěti dnů: P = proestrus, E = estrus, M = metestrus a D = diestrus. Osa y zobrazuje počet bakterií obsažených ve 20 μ l vaginálního výplachu.

Pro testování rozdílů v bakteriální abundanci mezi jednotlivými fázemi estrálního cyklu byly použity logaritmované hodnoty počtu bakterií (\log_{10}) ve 20 μl výplachu vaginální sliznice (Obr. č. 14). Test ANOVA prokázal, že ve vaginální sliznici dochází k signifikantním změnám v počtu bakterií ($df = 3$, $F = 6.637$, $P = 0.00083$). Pro detekci konkrétních rozdílů byl následně použit Tukeyův post-hoc test (95% konfidenční interval). V estru se ve vagině nacházelo signifikantně více bakterií než v následujících fázích - metestru ($P = 0.0009129$) a diestru ($P = 0.165818$). Mezi proestrem a estrem se objevoval mírný trend v nárůstu počtu bakterií ($P = 0.1452717$).



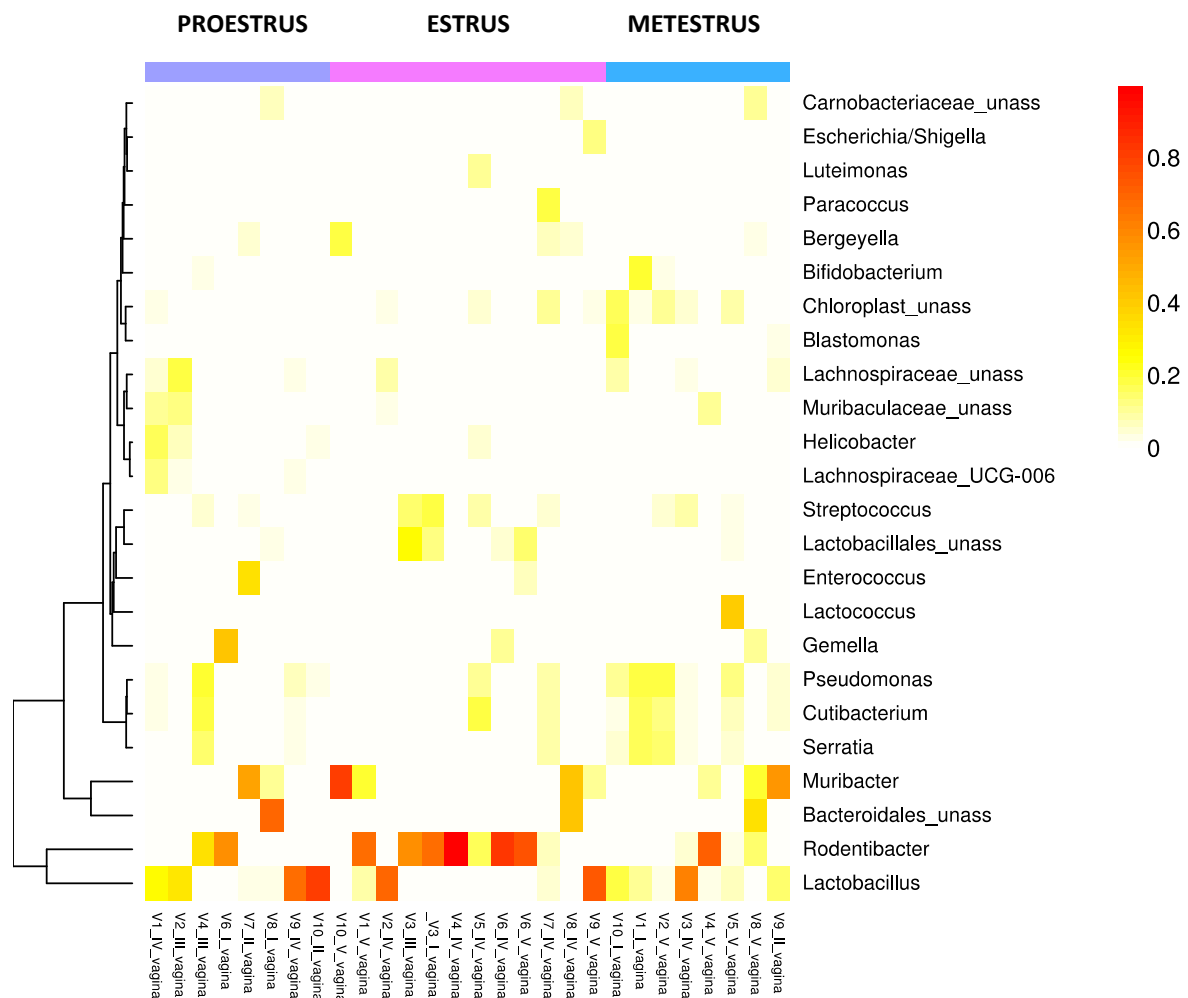
Obr. č. 14: Porovnání počtu bakterií ve vagině mezi jednotlivými fázemi estrálního cyklu. Symboly hvězdiček označují dosaženou hladinu významnosti v Tukeyově post-hoc testu vždy pro dvě zkoumané fáze, které jsou spojeny úsečkou: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Alfa diverzita vaginální mikrobioty byla měřena pomocí Chao1 a Shannonova indexu v průběhu tří fází estrálního cyklu: proestru, estru a metestru (Obr. č. 15). Rozdíly v diverzitě mezi fázemi byly testovány pomocí lineárních smíšených modelů a následně Tukeyovým post-hoc testem. Při použití Chao1 indexu nebyly tyto rozdíly signifikantní ($df = 2$, $\chi^2 = 2.2007$, $P = 0.3328$). Naopak dle Shannonova indexu se diverzita během estrálního cyklu signifikantně lišila ($df = 2$, $\chi^2 = 7.8748$, $P = 0.0195$). K významnému nárůstu diversity docházelo mezi estrem a metestrem (Tukeyův post-hoc test: $P = 0.00997$). V estru byla rozmanitost vaginální mikrobioty tedy významně nižší oproti metestru. V proestru dosahovala alfa diverzita středních hodnot.



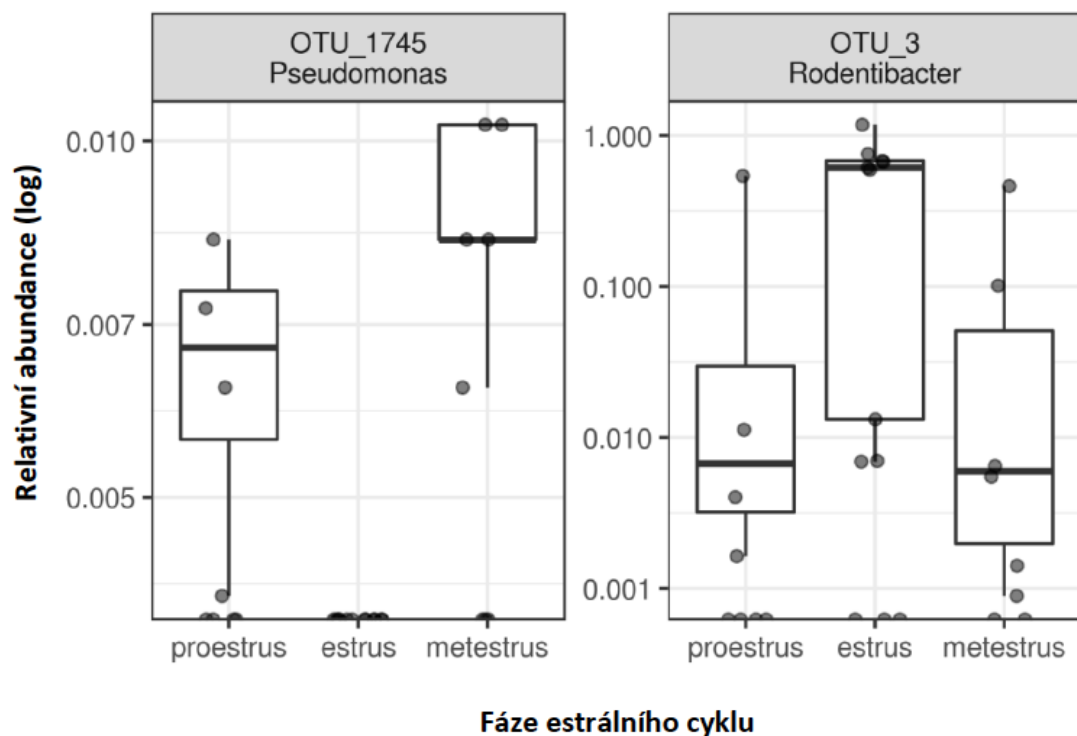
Obr. č. 15: Porovnání bakteriální alfa diverzity u vaginální mikrobioty v průběhu estrálního cyklu dle Chao1 (A) a Shannonova indexu (B). Výšky sloupců odpovídají predikovaným průměrům pro jednotlivé fáze a chybové úsečky 95% konfidenčním intervalům. Odlišná písmena uvedená nad jednotlivými sloupci označují signifikantní rozdíly alfa diverzity mezi fázemi estrálního cyklu dle Tukeyova post-hoc testu.

Hierarchické klastrování bakteriálních rodů ve vaginální sliznici bylo použito k zobrazení rozdílů mikrobioty mezi třemi fázemi estrálního cyklu: proestru, estru a metestru (Obr. č. 16). Do analýzy bylo zahrnuto 24 dominantních rodů a mikrobiotu vaginy tvořily především čtyři z nich: *Muribacter*, blíže neklasifikovaný rod z řádu Bacteroidales, *Rodentibacter* a *Lactobacillus*. Ve vzorcích pocházejících z estru byla oproti ostatním fázím detekována vysoká abundance rodu *Rodentibacter*. U dalších těchto jmenovaných rodů nebyly rozdíly tak markantní, např. abundance rodů *Lactobacillus* či *Muribacter* měly tendenci během estru klesat.



Obr. č. 16: Hierarchické klastrování dominantních bakteriálních rodů ve vaginální sliznici. Na ose x jsou uvedeny názvy vzorků, které zahrnují označení samice (V1 – V10) a den odběru vzorku z vaginální sliznice (I - V). Osa y zobrazuje bakteriální rody. Rody, které v jakémkoliv vzorku představovaly < 10 % sekvenčního čtení, nebyly do analýzy zahrnuty. Barevná škála od bílé po červenou udává relativní abundanci rodů v jednotlivých vzorcích.

Ke kvantifikaci rozdílů ve složení vaginální mikrobioty mezi fázemi proestrem, estrem a metestrem, byl použit Bray-Curtisův index nepodobnosti a vážená UniFrac vzdálenostní metrika. Testem PERMANOVA pro Bray-Curtisův index nepodobnosti bylo prokázáno, že ve vagině během estrálního cyklu docházelo k signifikantním změnám mikrobioty ($F(2,25) = 1.5501$, $P = 0.017$, $R^2 = 0.11032$). Tyto změny byly způsobeny rozdíly v relativní abundanci dvou OTU mezi estrem a ostatními fázemi. Jedním z těchto OTU byl *Pseudomonas* (OTU_1745), který se ve vagině nacházel během proestru i metestru, avšak v estru nebyl dále přítomný. Dalším byl *Rodentibacter* (OTU_3), u kterého se v estru ve srovnání s ostatními fázemi objevovala tendence k nárůstu jeho abundance (Obr. č. 17). Při použití vážené UniFrac vzdálenostní metriky byly rozdíly ve skladbě mikrobioty marginálně nesignifikantní ($F(2,25) = 1.6598$, $P = 0.084$, $R^2 = 0.11722$).



Obr. č. 17: Rozdíly v relativní abundanci u OTU *Pseudomonas* a *Rodentibacter* ve vagině během estrálního cyklu.

3.4 Vliv pohlaví na mikrobiotu

Efekt vlivu pohlaví byl testován pro bakteriální abundanci, bakteriální alfa diverzitu a taxonomické složení mikrobioty. Dle výsledků testu ANOVA se množství bakterií mezi samci a samicemi významně neodlišovalo ($df = 1$, $F = 0.709$, $P = 0.402$). Také na bakteriální diverzitu u jednotlivých sliznic neměl efekt pohlaví dle výsledků z lineárně smíšených modelů signifikantní vliv (pro Shannonův index: $df = 1$, $\chi^2 = 0.7544$, $P = 0.3851$ a pro Chao1 index: $df = 4$, $\chi^2 = 1.803$, $P = 0.1794$). Pomocí testu PERMANOVA nebyly také u žádné ze zkoumaných sliznic odhaleny signifikantní rozdíly mezi samci a samicemi v taxonomické skladbě mikrobioty (pro Bray-Curtisův index: $F(1,72) = 1.0135$, $P = 0.430$ a pro váženou vzdáleností UniFrac metriku: $F(1,72) = 1.217$, $P = 0.263$).

4 Diskuze

Jedním z důležitých výsledků této diplomové práce je potvrzení signifikantně odlišné kompozice mikrobioty mezi různými typy sliznic myši domácí. To platilo i v případě sekretů, které se mohou do určité míry prolínat - sekrety v nosní sliznici a ústní dutiny. Důvodem těchto rozdílů je souhrn vlastností daného prostředí, které na bakterie působí a selektuje tak jejich přežití. Tyto vlastnosti mohou zahrnovat například dostupnost živin, hodnotu pH, přítomnost kyslíku a činnost imunitního systému (Kilian et al., 2018). U ostatních živočichů, včetně člověka, byla také objevena intraindividuální variabilita v kompozici mikrobioty. Například mikrobiota v nosní a ústní dutině se u psů i člověka signifikantně odlišovala (Isaiah et al., 2017; Bassis et al., 2014). Také mikrobiota slin, moči a trusu netopýrů se významně lišila. Navíc se ukázalo, že téměř polovina detekovaných bakterií u těchto zkoumaných netopýrů byla místně specifická (Dietrich et al., 2017). Mikrobiota v rektu psů byla také výrazně odlišná oproti mikrobiotě v moči a genitáliích (Burton et al., 2017).

Ve vzorcích, které pocházely z výplachů nosní sliznice myši, jsme zaznamenali především hojné zastoupení rodů *Campylobacter* (Epsilonbacteraeota) a *Pseudomonas* (Proteobacteria). Vysoká abundance rodu *Campylobacter* v nose je v souladu i s předchozím výzkumem u křečka bavlníkového (Chaves-Moreno et al., 2015), nikoliv však u dalších zkoumaných živočichů zahrnující i laboratorní myši (Cangemi de Gutierrez et al., 1999; François et al., 2016; Dorn et al., 2017; Isaiah et al., 2017; Tress et al., 2017). Kampylobakterie nejsou obecně známy jako zástupci nosní mikrobioty, ale spíše jako patogenní mikroorganismy trávicího traktu, například *Campylobacter jejuni* (Black et al., 1988). Vzhledem k zanedbatelnému množství kampylobakterií ve vzorcích trusu u našich myší se však domníváme, že se skutečně jedná o mikrobiotu nosní sliznice, nikoliv o kontaminaci způsobenou například očicháváním trusu. Rod *Pseudomonas* byl také v předešlých výzkumech v nosní sliznici detekován jen v nízkých abundancích či vůbec (Cangemi de Gutierrez et al., 1999; Chaves-Moreno et al., 2015; François et al., 2016; Dorn et al., 2017; Isaiah et al., 2017; Tress et al., 2017). Výjimkou byla například prasata, u kterých se *Pseudomonas* stal třetím nejvíce abundantním rodem (Weese et al., 2014). Taktéž v nasální mikrobiotě člověka dominují odlišné rody bakterií ve srovnání s výsledky naší analýzy. Jsou jimi především rody z kmenů Actinobacteria a Firmicutes, jako například *Corynebacterium* a *Staphylococcus* (Frank et al., 2010; Biswas et al., 2015; Koskinen et al., 2018).

Významnou roli v utváření mikrobioty nosní sliznice zřejmě hraje okolní prostředí, kterému je tato sliznice permanentně vystavována (Lemon et al., 2010). Tomu odpovídá i fakt, že se jednalo o místo, kde jsme naměřili druhou nejvyšší hodnotu alfa diverzity ze všech zkoumaných sliznic. Zároveň je to však jedno z míst, kde se vyskytovalo nejméně bakterií. Vzhledem k tomu, že nos je vstupním místem dále do těla, pravděpodobným vysvětlením je významná regulace početnosti bakterií imunitním systémem hostitele (Kuntová et al., 2018).

Ve slinách myši domácí patřilo 69 % bakterií do kmene Firmicutes, druhým nejhojnějším kmenem byl Proteobacteria s 19% abundancí. Přestože alfa diverzita ve slinách nebyla v porovnání s ostatními sekrety nejnižší, tak je zajímavé, že až 54 % všech bakterií tvoří jeden konkrétní zástupce - rod *Streptococcus*. Taková situace je pozorovatelná ještě u vzorků moči, kde tento rod tvoří 53 % bakteriální populace. U ostatních sekretů se takto dominantní rody nevyskytují. Podobné mikrobiální složení ústní dutiny ukázaly i výsledky sekvenace DNA u laboratorních myší (Chun et al., 2010). Závěry vědeckých prací, které jsou staršího data a identifikace bakterií u nich probíhala na základě kultivačních metod, se od těchto výsledků v mnohém liší. Například v ústní dutině myší BALB/c se streptokoky nepodařilo detekovat vůbec nebo jen v nízkém množství. Nejvíce abundantními bakteriemi se naopak staly například *Staphylococcus aureus* a *Lactobacillus murinus* (Trudel et al., 1986; Rodrigue et al., 1993). Zvolené kultivační podmínky nemusí být vhodné pro růst všech bakterií a výsledné poznatky o skutečné skladbě mikrobioty tak mohou být velmi zkreslené.

K nejvíce abundantním kmenům ve slinách člověka patří, stejně jako u myší, kmény Firmicutes a Proteobacteria. Hojný je i kmen Actinobacteria, který však nebyl v našich vzorcích detekován. Rozdíly mezi slinami člověka a myšmi jsou patrné i na rodové úrovni. Kromě rodu *Streptococcus* byly ve slinách člověka objeveny především takové rody, které se v našich vzorcích nevyskytovaly, např. *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Prevotella* a *Porphyromona* (Aas et al., 2005; Lazarevic et al., 2009, Nasidze et al., 2009; Zaura et al., 2009; Hasan et al., 2014; Leake et al., 2016; Fan et al., 2018).

Některé publikace ukazují, že streptokokové v ústní dutině mohou zprostředkovaně ovlivňovat imunitní odpověď hostitele. *Streptococcus mitis* v ústech člověka úzce interaguje s přítomnými keratinocyty a spouští u nich aktivitu různých transkripčních faktorů (TF). Jeden z těchto TF (aryl hydrokarbonový receptor) má vliv i na genovou expresi imunitních signálních proteinů - chemokinů, které vyvolávají

zánětlivou reakci. Tento TF dále zvyšuje hladinu PGE2 (Prostaglandin E2), který se taktéž účastní zánětlivé reakce. Výsledky ukazují, že tento druh bakterie může napomáhat hojení epitelu v ústní dutině při jeho poškození (Engen et al., 2017).

Zatímco v naší analýze byla u vzorků z nosní sliznice naměřena vyšší alfa diverzita, než ve vzorcích z ústní dutiny, u psů tomu bylo naopak. Vzorky z ústní dutiny psů obsahovaly signifikantně vyšší hodnotu Chao1 a Shannonova indexu a také vyšší počet OTU, než druhý typ vzorků (Isaiah et al., 2017). Důvodem těchto protichůdných závěrů může být například způsob, jakým byly vzorky odebírány. My jsme vzorky odebírali pomocí výplachů nosní a ústní dutiny, ale ve druhém výzkumu byly vzorky získávány stěry nosní dutiny a bukální oblasti (Isaiah et al., 2017). Je možné, že stěry se lépe zachytí rozmanitost mikrobioty v ústní dutině, jak naznačuje i publikace od Rodrigue et al. (1989).

Jak již bylo zmíněno výše, v moči myší jsme detekovali vysokou abundanci rodu *Streptococcus* (52 %) z kmene Firmicutes. Dominance rodu *Streptococcus* se však neshoduje s výsledky výzkumů zaměřených na moč ostatních živočichů. V moči psů měl tento rod průměrnou relativní abundanci pouze 0,08 % (Burton et al., 2017). Také v moči netopýrů se vyskytovaly jiné hojněji zastoupené rody (Dietrich et al., 2017). Jako druhý nejvíce abundantní rod v moči myší jsme detekovali *Acinetobacter* (19 %) z kmene Proteobacteria. U psů byl druh *Acinetobacter johnsonii* jedním z pěti nejvíce hojných OTU, které byly detekovány u všech zkoumaných jedinců. Zbylé čtyři OTU patřily taktéž do kmene Proteobacteria (Burton et al., 2017).

V moči člověka, stejně jako ve vzorcích moči našich myší, se nejčastěji vyskytují bakterie kmene Firmicutes. Avšak namísto rodu *Streptococcus*, jsou v ní většinou přítomny jiné hojnější rody. Vysokou abundanci má například rod *Lactobacillus*, a to i v moči mužů (Nelson et al., 2010; Dong et al., 2011; Siddiqui et al., 2011; Wolfe et al., 2012; Hilt et al., 2014; Pearce et al., 2014; Coorevits et al., 2017). Tento rod byl v našich výsledcích zastoupen pouze v 6% abundanci. Mezi další rody, které byly detekovány v moči člověka a v našich výsledcích se naopak neobjevily, patří např.: *Prevotella*, *Gardnerella*, *Corynebacterium* a *Staphylococcus* (Dong et al., 2011; Siddiqui et al., 2011; Wolfe et al., 2012).

Ve vzorcích moči jsme detekovali také nejnižší bakteriální alfa diverzitu. Tento výsledek je v rozporu se závěrem jiného výzkumu, ve kterém byly porovnávány vzorky slin, moči a trusu afrických netopýrů. U nich byla překvapivě nejvyšší alfa diverzita naměřena právě v moči (Dietrich et al., 2017). U psů obsahovala moč signifikantně více

OTU, než vzorky pocházející z genitálního traktu a rektu. Vzorky s nejvyšší alfa diverzitou však představovaly stěry z rektu a nikoliv moč (Burton et al., 2007).

Nejvíce zastoupeným rodem ve vagině myši domácí byl *Rodentibacter* (22 %) z kmene Proteobacteria. Jedná se o poměrně nový bakteriální rod, do kterého byly zařazeny některé druhy bakterií s původním rodovým názvem *Pasteurella*, jako například *Pasteurella pneumotropica* (Adhikary et al., 2017). Překvapivě druhým nejhojnějším rodem byl *Lactobacillus* (16 %) z kmene Firmicutes. Většina předchozích výzkumů, které byly zaměřeny na vaginální mikrobiotu u různých živočichů, detekovaly tento rod ve velmi nízkých abundancích (Noguchi et al., 2003; Hutchins et al., 2014; Swartz et al., 2014; Yildirim et al., 2014; Uchihashi et al., 2015; Miller et al., 2017; Yang et al., 2017). Naproti tomu, u člověka tvoří laktobacily podstatnou část vaginální mikrobioty a jejich relativní abundance dosahuje běžně až 90 % (Ravel et al., 2011). Pomocí metody BLAST jsme blíže identifikovali konkrétní sekvence 16S rRNA z vaginálních vzorků. Hojně zastoupeným druhem byl např. *Lactobacillus animalis*. Dále jsme zjistili, že druhy, které se nachází ve vagině člověka, lze nalézt také ve vagině myši. Jsou jimi například *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus reuteri* (Vásquez et al., 2002; Hütt, et al., 2016).

Vaginální mikrobiota nebyla během estrálního cyklu konstantní, ale docházelo u ní k významným změnám týkající se její abundance, diverzity i taxonomického složení. Mezi estrem a následujícími fázemi - metestrem a diestrem, byl detekován významný pokles v počtu bakterií. Estrus jako fáze s vysokou bakteriální abundancí byl identifikován také v předchozích výzkumech zaměřených na laboratorní myši a další živočichy (Larsen et al., 1976, 1977; Yamada et al., 1983; Cowley a Heiss, 1991; Noguchi et al., 2003). V naší analýze jsme ukázali, že i když se množství bakterií v estru zvyšuje, bakteriální alfa diverzita je zde v porovnání s ostatními fázemi nižší. V rámci jednotlivých bakteriálních rodů jsme nejvýraznější nárůst v estru zaznamenali u *Rodentibacter* (OTU_3). Některé rody byly v této fázi naopak potlačeny jako např. *Pseudomonas*. Částečně je tento trend pozorovatelný i u rodů *Muribacter*, *Cutibacterium*, *Serratia* i *Lactobacillus*, zde ale analýza neposkytla signifikantní výsledky.

Ukazuje se tedy, že *Rodentibacter* během estru výrazně přispíval k nárůstu počtu bakterií ve vagině a je také možné, že jeho zvýšená abundance mohla potlačovat výskyt ostatních bakterií a tím tak snižovat diverzitu vaginální mikrobioty. U laboratorních myši byly v estru pomocí kultivačních metod detekovány bakterie z jiných rodů, především streptokokové (Cowley a Heiss, 1991; Noguchi et al., 2003) a laktobacily (Cowley a Heiss, 1991). Jak již bylo zmíněno výše, růst laktobacilů byl v naší analýze během estru

oproti ostatním fázím spíše potlačován a k nárůstu streptokoků během estru docházelo jen u několika málo jedinců.

Bakteriální kompozice v jednotlivých sekretech se alespoň částečně shodovala s dosavadními výsledky publikovanými u ostatních živočichů. Největší rozpor s dosud známými fakty jsme zaznamenali v případě mikrobioty trusu. Trus obsahoval zejména bakterie pocházející ze tří kmenů: Patescibacteria, Firmicutes a Bacteroidetes. Hojný výskyt kmenů Firmicutes a Bacteroidetes je v souladu i s výsledky předchozích výzkumů, které se zabývaly skladbou střevní mikrobioty u divokých či laboratorních myši (McKnite et al., 2012; Hildebrand et al., 2013; Krych et al., 2013; Linnenbrink et al., 2013; Kreisinger et al. 2014; Ericsson et al., 2015; Weldon et al., 2015) a člověka (Arumugam et al., 2011; Krych et al., 2013). Zatímco tyto dva kmény u ostatních výše zmíněných publikací zahrnují kolem 90 % všech bakterií, zde to bylo pouze 59 %.

Tento rozdíl byl způsoben tím, že podstatnou část střevní mikrobioty našich vzorků tvořil překvapivě taxon Patescibacteria, který byl s abundancí 35 % dokonce nejhojnějším kmenem v trusu vůbec. V tomto kmenu byl detekován pouze rod *Candidatus_Saccharimonas*. Ten byl v dosavadních výzkumech nalezen také ve střevě či trusu laboratorních myši a dalších savců (Ren et al., 2016; Curtis et al., 2018), ale nedosahoval u nich tak vysokého procentuálního zastoupení jako v naší analýze. Například v tenkém střevě laboratorních myši, konkrétně v kyčelníku u deseti jedinců, se tento rod vyskytoval s abundancí 0,3 %. I přes to byl druhým nejhojnějším rodem (Ren et al., 2016). Kmen Patescibacteria v trusu dalšího hlodavce - hraboše prériového, představoval třetí nejhojnější kmen s abundancí 5 %. Sekvence tohoto kmenu byly dále klasifikovány a patřily právě rodu *Candidatus_Saccharimonas* (Curtis et al., 2018). V trusu laboratorních krys docházelo k signifikantnímu nárůstu bakterií tohoto rodu poté, co jim byla podávána potrava s vysokým obsahem tuku (Lin et al., 2016). Myši, které byly používány pro experimentální část této diplomové práce, však nedostávaly potravu s vysokým obsahem tuku, ale byly krmeny standardní komplexní krmnou směsí (3,4 % tuku/1kg).

Mezi samci a samicemi divokých jedinců myši domácí nebyl prokázán signifikantní rozdíl v bakteriální abundanci, alfa diverzitě a ani v taxonomickém složení mikrobioty u žádné ze zkoumaných sliznic. V předchozích výzkumech, které byly zaměřeny na laboratorní myši či krys, byl však vliv pohlaví odhalen u alfa diverzity i kompozice střevní mikrobioty (Bernbom et al., 2006; Fushuku a Fukuda, 2008; Markle et al., 2013; Yurkovetskiy et al., 2013; Org et al., 2016; Elderman et al., 2018). Ukázalo se,

že vliv tohoto faktoru nelze prokázat, pokud jsou myši z různých laboratorních kmenů testovány současně. Rozdíly mezi samci a samicemi se projevily pouze v rámci jednotlivých kmenů myší. Střevní mikrobiota je tedy silně ovlivňována genotypem a rozdíly mezi pohlavími se v geneticky uniformních kmenech laboratorních myší mohou více projevit (Org et al., 2016; Elderman et al. 2018). Jedním z důvodů, proč se nepodařilo prokázat vliv pohlaví v této diplomové práci, může být tedy velká genetická variabilita u jedinců divokých myší.

Některé rozdíly ve střevní mikrobiotě byly však prokázány i mezi muži a ženami (Mueller et al., 2006; Dominianni et al., 2015). V úvahu tedy připadají i jiné důvody, proč se nepodařilo prokázat vliv pohlaví u střevní mikrobioty, jako je například zvolení nízkého počtu testovaných jedinců. Nelze vyloučit fakt, že při vyšším počtu myší by rozdíly mezi samci a samicemi byly signifikantní. Například v publikaci od Elderman et al. (2018) se rozdílné hodnoty alfa diverzity střevní mikrobioty podařilo prokázat s použitím 20 samců a 20 samic. Oproti tomu, pro rozdíly v kompozici mikrobioty stačilo pouze deset samců a deset samic, tedy podobný počet jako zde.

Také na mikrobiotu nosní sliznice a ústní dutiny neměl efekt pohlaví významný vliv. Příčina může být taková, že se jedná o místa, která jsou neustále vystavována vnějšímu prostředí a samci i samice jsou tak kolonizovány stejnými bakteriemi pocházejícími z bezprostředního okolí (Shaw et al., 2010). Například u psů a fen stejného plemene, kteří obývali to samé prostředí a byli krmeni stejným typem potravy, nebyl prokázán žádný rozdíl v alfa diverzitě a kompozici u orální nebo nasální mikrobioty (Isaiah et al., 2017). Taktéž u lidí nebyl detekován signifikantní rozdíl v kompozici mikrobioty vyskytující se v nosu (Lemon et al., 2010; Oh et al., 2012). Stejně tomu bylo i v případě orální mikrobioty lidí (Kapil et al., 2018).

Pohlavní rozdíly jsme nedetekovali ani v mikrobiotě moči myši domácí. Shodný závěr ukazuje i výzkum zaměřen na moč psů, kde nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi samci a samicemi v počtu OTU, alfa diverzitě nebo kompozici mikrobioty (Burton et al., 2017). Existují však i práce, které pohlavní rozdíly v mikrobiotě moči potvrdily, konkrétně u člověka (Fouts et al., 2012; Lewis et al., 2013).

Naše výsledky ukazují, že mikrobiom jedince je diverzifikován v různých částech těla. Vzhledem k již prokázaným odlišnostem ve složení různých antimikrobiálních peptidů či jiných bílkovin ve studovaných sekretech je zřejmé, že rozdílné složení mikrobioty je řízeno aktivní regulací hostitelského imunitního systému (Stopka et al., 2016; Stopková et al., 2017; Černá et al., 2017).

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala mikrobiotou ve vybraných sliznicích u divoké populace myši domácí. Hlavním cílem bylo zjistit, zda se sliznice skladbou své mikrobioty odlišují. Podařilo se nám prokázat, že jednotlivé sliznice jsou specifické svým bakteriálním taxonomickým složením již na rodové úrovni a také jsme odhalili rozdíly v bakteriální abundanci a alfa diverzitě. Naše výsledky tak byly v souladu se závěry předchozích publikací, které taktéž odhalily rozdíly v mikrobiotě mezi různými analyzovanými částmi těla, avšak zastoupení jednotlivých bakteriálních taxonů v našich zkoumaných vzorcích bylo odlišné. Nejvíce bakterií a také největší alfa diverzitu jsme detekovali ve vzorcích trusu. Naopak nejméně bakterií obsahovaly vzorky nosní sliznice spolu s močí. Moč byla také místem s nejnižší alfa diverzitou. Některé konkrétní výsledky, jako např. vyšší alfa diverzita v nosní sliznici oproti ústní dutině, se oproti předchozím výzkumům však liší. Na utváření mikrobioty působí spousta různých genetických i environmentálních faktorů a porovnávání jejího složení v dané sliznici mezi různými publikacemi, které se zabývají odlišnými či dokonce i stejnými živočišnými druhy, může mnohdy přinést velmi rozdílné výsledky. Také odlišnosti v použité metodice mohou přispívat ke značným odchylkám v konečných závěrech.

Detailně jsme se zaměřili také na jedno z těchto zkoumaných míst - vaginální sliznici s cílem detekovat změny mikrobioty v průběhu estrálního cyklu. Zde se nám taktéž podařilo prokázat určité změny ve všech výše zmíněných bodech. Některé rozdíly (např. růst bakterií mezi fázemi proestrem a estrem) nebyly dostatečně signifikantní a použití více testovaných samic či větší množství prováděných odběrů by mohlo přinést silnější výsledky. Shodně jako v předchozích výzkumech se tedy ukazuje, že skladba vaginální mikrobioty podstupuje dynamické změny v souvislosti s právě probíhající fází estrálního cyklu. Tyto změny byly nejvíce zřetelné ve fázi estru, během kterého jsme ve vagině detekovaly nejvíce bakterií, především rodu *Rodentibacter*. Výrazný růst tohoto rodu během estru může mít dopad na ostatní přítomné bakteriální populace, což naznačuje i nízká hodnota alfa diverzity v porovnání s ostatními fázemi.

Poslední cíl zahrnoval detekci vlivu jednoho z možných faktorů ovlivňujícího mikrobiotu, tedy vlivu pohlaví. Zde nám však naše provedené analýzy neposkytly signifikantní výsledky. Je možné, že vliv pohlaví není tak silným faktorem podílejícím se na utváření mikrobioty a jeho působení může být snadno potlačeno ostatními faktory.

Ovšem závěry některých dosavadních publikací naznačují existenci mikrobiálních pohlavních rozdílů u živočichů včetně člověka.

Předchozí výzkumy prokázaly, že námi studované sliznice mají i odlišné složení antimikrobiálních peptidů a proteinů a výsledky této diplomové práce tak mohou být podkladem k dalšímu podrobnějšímu výzkumu interakcí konkrétních bakteriálních populací s hostitelskými proteiny a peptidy u divokých jedinců myši domácí.

7 Reference

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732.
- Adhikary, S., Nicklas, W., Bisgaard, M., Boot, R., Kuhnert, P., Waberschek, T., Aalbæk, B., Korczak, B., Christensen, H. (2017). *Rodentibacter* gen. nov. including *Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov., *Rodentibacter heylii* sp. nov., *Rodentibacter myodis* sp. nov., *Rodentibacter ratti* sp. nov., *Rodentibacter heidelbergensis* sp. nov., *Rodentibacter trehalosifermentans* sp. nov., *Rodentibacter rarus* sp. nov., *Rodentibacter mrazii* and two genomospecies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1793–1806.
- Anderson, M., Bollinger, D., Hagler, A., Hartwell, H., Rivers, B., Ward, K., Steck, T. R. (2004). Viable but nonculturable bacteria are present in mouse and human urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 753–8.
- Arentsen, T., Raith, H., Qian, Y., Forssberg, H., Heijtz, R. D. (2015). Host microbiota modulates development of social preference in mice. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26(0), 29719.
- Aronson, M., Medalia, O., Schori, L., Mirelman, D., Sharon, N., Ofek, I. (1979). Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *The Journal of Infectious Diseases*, 139(3), 329–32.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclers, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium (additional members), Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180.
- Awramik, S. M., Schopf, J. W., Walter, M. R. (1983). Filamentous fossil bacteria from the Archean of Western Australia. *Precambrian Research*, 20(2-4), 357–374.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718–15723.
- Baquero, F. a Nombela, C. (2012). The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 2–4.
- Barfod, K., Roggenbuck, M., Hansen, L., Schjørring, S., Larsen, S., Sørensen, S., Krogh, K. (2013). The murine lung microbiome in relation to the intestinal and vaginal bacterial communities. *BMC Microbiology*, 13(1), 303.
- Bassis, C. M., Tang, A. L., Young, V. B., Pynnonen, M. A. (2014). The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome*, 2(1), 27.
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., Zhang, M., Oh, P. L., Nehrenberg, D., Hua, K., Kachman, S. D., Moriyama, E. N., Walter, J., Peterson, D. A., Pomp, D. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 18933–18938.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K. D., Verdu, E. F., Collins, S. M. (2011). The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology*, 141(2), 599–609.e3.
- Bernbom, N., Nørrung, B., Saadbye, P., Mølbak, L., Vogensen, F. K., Licht, T. R. (2006). Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: Effects of time, host and gender. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 87–95.
- Berry, A., Bellisario, V., Capoccia, S., Tirassa, P., Calza, A., Alleva, E., Cirulli, F. (2012). Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology*, 37(6), 762–772.
- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111–118.
- Biswas, K., Hoggard, M., Jain, R., Taylor, M. W., Douglas, R. G. (2015). The nasal microbiota in health and disease: variation within and between subjects. *Frontiers in Microbiology*, 9, 134.
- Björne, H., Petersson, J., Phillipson, M., Weitzberg, E., Holm, L., Lundberg, J. O. (2004). Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *Journal of Clinical Investigation*, 113(1), 106–114.
- Bocci, V. (1992). The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspectives in Biology and Medicine*, 35(2), 251–60.

- Boettcher, K. J. a Ruby, E. G. (1990).** Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3701–3706.
- Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Parker, J. P. M., Zubietta, I. X., Piceno, Y. M., Andersen, G. L. (2007).** Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 299–304.
- Burkholder, P. R. a McVeigh, I. (1942).** Synthesis of Vitamins by Intestinal Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28(7), 285–9.
- Burton, E. N., Cohn, L. A., Reinero, C. N., Rindt, H., Moore, S. G., Ericsson, A. C. (2017).** Characterization of the urinary microbiome in healthy dogs. *PLoS One*, 12(5), e0177783.
- Butcher, R. L., Collins, W. E., Fugo, N. W. (1974).** Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 β Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat. *Endocrinology*, 94(6), 1704–1708.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., Taft, R. A. (2012).** Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE*, 7(4), e35538.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. (2016).** DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- Callewaert, C., Kerckhof, F.-M., Granitsiotis, M. S., Van Gele, M., Van de Wiele, T., Boon, N. (2013).** Characterization of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* Clusters in the Human Axillary Region. *PLoS One*, 8(8), e70538.
- Cangemi de Gutierrez, R., Miguel de Nader, O., Ruiz Holgado, A. P. de, Nader-Macias, M. E. (1999).** Microbial flora variations in the respiratory tract of mice. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(5), 701–707.
- Caporaso, J. G., Bittinger, K., Bushman, F. D., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Knight, R. (2010).** PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, 26(2), 266–267. 1
- Carmody, R. N., Gerber, G. K., Luevano, J. M., Gatti, D. M., Somes, L., Svenson, K. L., Turnbaugh, P. J. (2015).** Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota. *Cell Host & Microbe*, 17(1), 72–84.
- Chao, A. (1984).** Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*. WileyBoard of the Foundation of the Scandinavian Journal of Statistics.
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2013).** The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, 18(6), 666–673.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., Knight, R. (2012).** The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*, 148(6), 1258–1270.
- Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., Denamur, E. (2011).** Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 654–662.
- Coorevits, L., Heytens, S., Boelens, J., Claeys, G. (2017).** The resident microflora of voided midstream urine of healthy controls: standard versus expanded urine culture protocols. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(4), 635–639.
- Cowley, H. M. a Heiss, G. S. (1991).** Changes in Vaginal Bacterial Flora During the Oestrous Cycle of the Mouse. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 4(4), 229–235.
- Curtis, J. T., Assefa, S., Francis, A., Köhler, G. A. (2018).** Fecal microbiota in the female prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *PLoS One*, 13(3), e0190648.
- Curtiss, N., Balachandran, A., Krska, L., Peppiatt-Wildman, C., Wildman, S., Duckett, J. (2017).** A case controlled study examining the bladder microbiome in women with Overactive Bladder (OAB) and healthy controls. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 214, 31–35.
- Černá, M., Kuntová, B., Talacko, P., Stopková, R., Stopka, P. (2017).** Differential regulation of vaginal lipocalins (OBP, MUP) during the estrous cycle of the house mouse. *Scientific Reports*, 7(1), 11674.
- Degroote, S., Hunting, D. J., Baccarelli, A. A., Takser, L. (2016).** Maternal gut and fetal brain connection: Increased anxiety and reduced social interactions in Wistar rat offspring following peri-conceptual antibiotic exposure. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 71, 76–82.
- Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2014).** Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular Psychiatry*, 19(2), 146–148.

- Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R. D., Cotter, P. D., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2015). Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 165–173.
- Dietrich, M., Kearney, T., Seamark, E. C. J., Markotter, W. (2017). The excreted microbiota of bats: evidence of niche specialisation based on multiple body habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 364(1), fnw284.
- Domianni, C., Sinha, R., Goedert, J. J., Pei, Z., Yang, L., Hayes, R. B., Ahn, J. (2015). Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence the Human Gut Microbiome. *PLoS One*, 10(4), e0124599.
- Dong, Q., Nelson, D. E., Toh, E., Diao, L., Gao, X., Fortenberry, J. D., Van der Pol, B. (2011). The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. *PLoS One*, 6(5), e19709.
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., Bultman, S. J. (2011). The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism*, 13(5), 517–526.
- Dooley, C. P., Cohen, H., Fitzgibbons, P. L., Bauer, M., Appleman, M. D., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J. (1989). Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Histologic Gastritis in Asymptomatic Persons. *New England Journal of Medicine*, 321(23), 1562–1566.
- Dorn, E. S., Tress, B., Suchodolski, J. S., Nisar, T., Ravindran, P., Weber, K., Hartmann, K., Schulz, B. S. (2017). Bacterial microbiome in the nose of healthy cats and in cats with nasal disease. *PLoS One*, 12(6), e0180299.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. 1
- Elderman, M., Hugenholtz, F., Belzer, C., Boekschoten, M., van Beek, A., de Haan, B., Savelkoul, H., de Vos, P., Faas, M. (2018). Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. *Biology of Sex Differences*, 9(1), 26.
- Engen, S. A., Rørvik, G. H., Schreurs, O., Blix, I. J., Schenck, K. (2017). The oral commensal *Streptococcus mitis* activates the aryl hydrocarbon receptor in human oral epithelial cells. *International Journal of Oral Science*, 9(3), 145–150.
- Ericsson, A. C., Davis, J. W., Spollen, W., Bivens, N., Givan, S., Hagan, C. E., McIntosh, M., Franklin, C. L. (2015). Effects of Vendor and Genetic Background on the Composition of the Fecal Microbiota of Inbred Mice. *PLoS One*, 10(2), e0116704.
- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., Holmes, K. K. (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(2), 251–6.
- Fan, X., Alekseyenko, A. V., Wu, J., Peters, B. A., Jacobs, E. J., Gapstur, S. M., Purdue, M. P., Abnet, C. C., Stolzenberg-Solomon, R., Miller, G., Ravel, J., Hayes, R. B., Ahn, J. (2018). Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut*, 67(1), 120–127.
- Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C. L., Knight, R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17994–17999.
- Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B.-H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, M. C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R. L., Miller, J. F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G. M., Li, H. (2013). *Propionibacterium acnes* Strain Populations in the Human Skin Microbiome Associated with Acne. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 2152–2160.
- François, A., Grebert, D., Rhimi, M., Mariadassou, M., Naudon, L., Rabot, S., Meunier, N. (2016). Olfactory epithelium changes in germfree mice. *Scientific Reports*, 6(1), 24687.
- Frank, D. N., Feazel, L. M., Bessesen, M. T., Price, C. S., Janoff, E. N., Pace, N. R. (2010). The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus aureus* Carriage. *PLoS ONE*, 5(5), e10598.
- Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., Marrazzo, J. M. (2005). Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. *New England Journal of Medicine*, 353(18), 1899–1911.
- Fröhlich, E. E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jačan, A., Wagner, B., Zinser, E., Bordag, N., Magnes, C., Fröhlich, E., Kashofer, K., Gorkiewicz, G., Holzer, P. (2016). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, 56, 140–155.
- Fouts, D. E., Pieper, R., Szpakowski, S., Pohl, H., Knoblach, S., Suh, M.-J., Huang, S.-T., Ljungberg, I., Sprague, B. M., Lucas, S. K., Torralba, M., Nelson, K. E., Groah, S. L. (2012). Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 174.
- Fushuku, S. a Fukuda, K. (2008). Gender Difference in the Composition of Fecal Flora in Laboratory Mice, as Detected by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Experimental Animals*, 57(5), 489–493.
- Gadbois, T., Marcotte, H., Rodrigue, L., Coulombe, C., Goyette, N., Lavoie, M. C. (1993). Distribution of the Resident Oral Bacterial Populations in Different Strains of Mice. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6(5), 245–251.

- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schutte, U. M. E., Zhong, X., Koenig, S. S. K., Fu, L., Ma, Z., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L. J., Ravel, J. (2012). Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Science Translational Medicine*, 4(132), 132ra52–132ra52.
- Gareau, M. G., Wine, E., Rodrigues, D. M., Cho, J. H., Whary, M. T., Philpott, D. J., MacQueen, G., Sherman, P. M. (2011). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*, 60(3), 307–317.
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., Nelson, K. E. (2006). Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, 312(5778), 1355–1359.
- Goldman, J. M., Murr, A. S., Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84–97.
- Graham, J. E., Moore, J. E., Jiru, X., Moore, J. E., Goodall, E. A., Dooley, J. S. G., Hayes, V. E. A., Dartt, D. A., Downes, C. S., Moore, T. C. B. (2007). Ocular Pathogen or Commensal: A PCR-Based Study of Surface Bacterial Flora in Normal and Dry Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(12), 5616–5623.
- Hagberg, L., Hull, R., Hull, S., Falkow, S., Freter, R., Svanborg Edén, C. (1983). Contribution of adhesion to bacterial persistence in the mouse urinary tract. *Infection and Immunity*, 40(1), 265–72.
- Hawksworth, G., Drasar, B. S., Hili, M. J. (1971). Intestinal Bacteria And The Hydrolysis Of Glycosidic Bonds. *Journal of Medical Microbiology*, 4(4), 451–459.
- Hedengren-Olcott, M., Olcott, M. C., Mooney, D. T., Ekengren, S., Geller, B. L., Taylor, B. J. (2004). Differential activation of the NF-kappaB-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 21121–7.
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 3047–3052.
- Heldt, S. A., Stanek, L., Chhatwal, J. P., Ressler, K. J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry*, 12(7), 656–670.
- Hildebrand, F., Nguyen, T. L. A., Brinkman, B., Yunta, R., Cauwe, B., Vandenaabeele, P., Liston, A., Raes, J. (2013). Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biology*, 14(1), R4.
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y.-Y., Knight, R., Ahima, R. S., Bushman, F., Wu, G. D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137(5), 1716–24.e1–2.
- Hiremath, P. S., Bannigidad, P., Yelgond, S. S. (2012). Identification of Flagellated or Fimbriated Bacterial Cells using Digital Image Processing Techniques. *International Journal of Computer Applications*, 59(12), 12–16.
- Huang, Y., Yang, B., Li, W. (2016). Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(7), 643.e7–643.e12.
- Hutchins, R. G., Vaden, S. L., Jacob, M. E., Harris, T. L., Bowles, K. D., Wood, M. W., Bailey, C. S. (2014). Vaginal microbiota of spayed dogs with or without recurrent urinary tract infections. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(2), 300–4.
- Hvidberg, H., Struve, C., Kroghfelt, K. A., Christensen, N., Rasmussen, S. N., Frimodt-Møller, N. (2000). Development of a long-term ascending urinary tract infection mouse model for antibiotic treatment studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), 156–63.
- Hyde, E. R., Luk, B., Cron, S., Kusic, L., McCue, T., Bauch, T., Kaplan, H., Tribble, G., Petrosino, J. F., Bryan, N. S. (2014). Characterization of the rat oral microbiome and the effects of dietary nitrate. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 249–257.
- Chaban, B., Links, M. G., Jayaprakash, T., Wagner, E. C., Bourque, D. K., Lohn, Z., Albert, A. Y., van Schalkwyk, J., Reid, G., Hemmingsen, S. M., Hill, J. E., Money, D. M. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome*, 2(1), 23.
- Chaves-Moreno, D., Plumeier, I., Kahl, S., Krismer, B., Peschel, A., Oxley, A. P. A., Jauregui, R., Pieper, D. H. (2015). The microbial community structure of the cotton rat nose. *Environmental Microbiology Reports*, 7(6), 929–935.
- Chen, Z.-Y., Jing, D., Bath, K. G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C.-J., Herrera, D. G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B. S., Hempstead, B. L., Lee, F. S. (2006). Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*, 314(5796), 140–3.
- Chromek, M., Slamová, Z., Bergman, P., Kovács, L., Podracká, L., Ehrén, I., Hökfelt, T., Gudmundsson, G. H., Gallo, R. L., Agerberth, B., Brauner, A. (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature Medicine*, 12(6), 636–41.

- Chun, J., Kim, K. Y., Lee, J.-H., Choi, Y. (2010). The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiology*, 10(1), 101.
- Costea, P. I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M. J., Bushman, F. D., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D., Fraser, C. M., Hattori, M., Huttenhower, C., Jeffery, I. B., Knights, D., Lewis, J. D., Ley, R. E., Ochman, H., O'Toole, P. W., Quince, C., Relman, D. A., Shanahan, F., Sunagawa, S., Wang, J., Weinstock, G. M., Wu, G. D., Zeller, G., Zhao, L., Raes, J., Knight, R., Bork, P. (2018). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology*, 3(1), 8–16.
- Hasan, N. A., Young, B. A., Minard-Smith, A. T., Saeed, K., Li, H., Heizer, E. M., McMillan, N. J., Isom, R., Abdullah, A. S., Bornman, D. M., Faith, S. A., Choi, S. Y., Dickens, M. L., Cebula, T. A., Colwell, R. R. (2014). Microbial Community Profiling of Human Saliva Using Shotgun Metagenomic Sequencing.
- Hütt, P., Lapp, E., Štěpetova, J., Smidt, I., Taelma, H., Borovkova, N., Oopkaup, H., Ahelik, A., Rööp, T., Hoidmets, D., Samuel, K., Salumets, A., Mändar, R. (2016). Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 27(0), 30484.
- Isaiah, A., Hoffmann, A. R., Kelley, R., Mundell, P., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. (2017). Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. *PLoS One*, 12(9), e0184899.
- Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D. R. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell*, 139(3), 485–498.
- Ivanov, I. I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., Finlay, B. B., Littman, D. R. (2008). Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host & Microbe*, 4(4), 337–349.
- Jang, S.-E., Lim, S.-M., Jeong, J.-J., Jang, H.-M., Lee, H.-J., Han, M. J., Kim, D.-H. (2018). Gastrointestinal inflammation by gut microbiota disturbance induces memory impairment in mice. *Mucosal Immunology*, 11(2), 369–379.
- Jiang, H., Lei, R., Ding, S.-W., Zhu, S. (2014). Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 182.
- Kapil, V., Haydar, S. M. A., Pearl, V., Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Ahluwalia, A. (2013). Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. *Free Radical Biology and Medicine*, 55, 93–100.
- Kapil, V., Rathod, K. S., Khambata, R. S., Bahra, M., Velmurugan, S., Purba, A., S. Watson, D., Barnes, M. R., Wade, W. G., Ahluwalia, A. (2018). Sex differences in the nitrate-nitrite-NO• pathway: Role of oral nitrate-reducing bacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 126, 113–121. 86
- Karstens, L., Asquith, M., Davin, S., Stauffer, P., Fair, D., Gregory, W. T., Rosenbaum, J. T., McWeeney, S. K., Nardos, R. (2016). Does the Urinary Microbiome Play a Role in Urgency Urinary Incontinence and Its Severity? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 78.
- Kaushic, C., Frauendorf, E., Rossoll, R. M., Richardson, J. M., Wira, C. R. (1998). Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 39(3), 209–16.
- Kilian, M. (2018). The oral microbiome - friend or foe? *European Journal of Oral Sciences*, 126, 5–12.
- Kim, S. V., Xiang, W. V., Kwak, C., Yang, Y., Lin, X. W., Ota, M., Sarpel, U., Rifkin, D. B., Xu, R., Littman, D. R. (2013). GPR15-Mediated Homing Controls Immune Homeostasis in the Large Intestine Mucosa. *Science*, 340(6139), 1456–1459.
- Klebanoff, S. J., Hillier, S. L., Eschenbach, D. A., Waltersdorff, A. M. (1991). Control of the Microbial Flora of the Vagina by H2O2-Generating Lactobacilli. *The Journal of Infectious Diseases*, 164(1), 94–100.
- Knights, D., Ward, T. L., McKinlay, C. E., Miller, H., Gonzalez, A., McDonald, D., Knight, R. (2014). Rethinking "enterotypes". *Cell Host & Microbe*, 16(4), 433–7.
- Koskinen, K., Reichert, J. L., Hoier, S., Schachenreiter, J., Duller, S., Moissl-Eichinger, C., Schöpf, V. (2018). The nasal microbiome mirrors and potentially shapes olfactory function. *Scientific Reports*, 8(1), 1296.
- Kostic, A. D., Howitt, M. R., Garrett, W. S. (2013). Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development*, 27(7), 701–718.
- Kovacs, A., Ben-Jacob, N., Tayem, H., Halperin, E., Iraqi, F. A., Gophna, U. (2011). Genotype Is a Stronger Determinant than Sex of the Mouse Gut Microbiota. *Microbial Ecology*, 61(2), 423–428.
- Kralik, P. a Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8, 108.
- Kreisinger, J., Čížková, D., Vohánka, J., Piálek, J. (2014). Gastrointestinal microbiota of wild and inbred individuals of two house mouse subspecies assessed using high-throughput parallel pyrosequencing. *Molecular Ecology*, 23(20), 5048–5060.

- Krych, L., Hansen, C. H. F., Hansen, A. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S. (2013).** Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta-Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View towards the Human Gut Microbiome. *PLoS One*, 8(5), e62578.
- Kuntová, B., Stopková, R., Stopka, P. (2018).** Transcriptomic and Proteomic Profiling Revealed High Proportions of Odorant Binding and Antimicrobial Defense Proteins in Olfactory Tissues of the House Mouse. *Frontiers in Genetics*, 9, 26.
- Larsen, B., Markovetz, A. J., Galask, R. P. (1976).** Quantitative alterations in the genital microflora of female rats in relation to the estrous cycle. *The Journal of Infectious Diseases*, 134(5), 486–9.
- Larsen, B., Markovetz, A. J., Galask, R. P. (1977).** Relationship of vaginal cytology to alterations of the vaginal microflora of rats during the estrous cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(3), 556–62.
- Larsen, B., Markovetz, A. J., Galask, R. P. (1978).** Spatial relationship of the genital microflora to the vaginal epithelium of female rats: transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(2), 444–9.
- Lazarevic, V., Whiteson, K., Huse, S., Hernandez, D., Farinelli, L., Østerås, M., Schrenzel, J., François, P. (2009).** Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 266–271.
- Leake, S. L., Pagni, M., Falquet, L., Taroni, F., Greub, G. (2016).** The salivary microbiome for differentiating individuals: proof of principle. *Microbes and Infection*, 18(6), 399–405.
- Leclaire, S., Jacob, S., Greene, L. K., Dubay, G. R., Drea, C. M. (2017).** Social odours covary with bacterial community in the anal secretions of wild meerkats. *Scientific Reports*, 7(1), 3240.
- Leclaire, S., Nielsen, J. F., Drea, C. M. (2014).** Bacterial communities in meerkat anal scent secretions vary with host sex, age, and group membership. *Behavioral Ecology*, 25(4), 996–1004.
- Lemon, K. P., Klepac-Ceraj, V., Schiffer, H. K., Brodie, E. L., Lynch, S. V., Kolter, R. (2010).** Comparative Analyses of the Bacterial Microbiota of the Human Nostril and Oropharynx. *mBio*, 1(3), e00129–10.
- Leviton, A. a Hargrove, R. E. (1952).** Microbiological Synthesis of Vitamin B₁₂ by Propionic Acid Bacteria. *Industrial & Engineering Chemistry*, 44(11), 2651–2655.
- Lewis, D. A., Brown, R., Williams, J., White, P., Jacobson, S. K., Marchesi, J. R., Drake, M. J. (2013).** The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 41.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., Gordon, J. I. (2005).** Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070–11075.
- Li, H., Duncan, C., Townsend, J., Killham, K., Smith, L. M., Johnston, P., Dykhuizen, R., Kelly, D., Golden, M., Benjamin, N., Leifert, C. (1997).** Nitrate-reducing bacteria on rat tongues. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 924–30.
- Li, Q., Korzan, W. J., Ferrero, D. M., Chang, R. B., Roy, D. S., Buchi, M., Lemon, J. K., Kaur, A. W., Stowers, L., Fendt, M., Liberles, S. D. (2013).** Synchronous Evolution of an Odor Biosynthesis Pathway and Behavioral Response. *Current Biology*, 23(1), 11–20.
- Lin, H., An, Y., Hao, F., Wang, Y., Tang, H. (2016).** Correlations of Fecal Metabonomic and Microbiomic Changes Induced by High-fat Diet in the Pre-Obesity State. *Scientific Reports*, 6(1), 21618.
- Linnarsson, S., Björklund, A., Ernfors, P. (1997).** Learning Deficit in BDNF Mutant Mice. *European Journal of Neuroscience*, 9(12), 2581–2587.
- Linnenbrink, M., Wang, J., Hardouin, E. A., Künzel, S., Metzler, D., Baines, J. F. (2013).** The role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. *Molecular Ecology*, 22(7), 1904–1916.
- Loong, S. K., Mahfodz, N. H., Che Mat Seri, N. A. A., Mohamad Wali, H. A., Abd Gani, S. A., Wong, P.-F., AbuBakar, S. (2016).** Genetic characterization of commensal *Escherichia coli* isolated from laboratory rodents. *SpringerPlus*, 5(1), 1035.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, P. V. (2010).** *Brock Biology of Microorganisms*. Benjamin Cummings, 13th ed. 1152 s. ISBN-13: 978-0321649638.
- Mandl, A. M. (1951).** Cyclical Changes in the Vaginal Smear of Adult Ovariectomized Rats. *Journal of Experimental Biology*, 28(4), 585–592.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., Tanno, A. P. (2002).** Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A), 609–14.
- Marchesi, J. R., Ravel, J. (2015).** The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 31.
- Markle, J. G. M., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolle-Kampczyk, U., von Bergen, M., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., Danska, J. S. (2013).** Sex Differences in the Gut Microbiome Drive Hormone-Dependent Regulation of Autoimmunity. *Science*, 339(6123), 1084–1088.

- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., Kasper, D. L. (2005).** An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell*, 122(1), 107–118.
- McFall-Ngai, M., Montgomery, M. K. (1990).** The Anatomy and Morphology of the Adult Bacterial Light Organ of *Euprymna scolopes* Berry (Cephalopoda:Sepiolidae). *The Biological Bulletin*, 179(3), 332–339.
- McKnight, G. M., Smith, L. M., Drummond, R. S., Duncan, C. W., Golden, M., Benjamin, N. (1997).** Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*, 40(2), 211–214.
- McKnite, A. M., Perez-Munoz, M. E., Lu, L., Williams, E. G., Brewer, S., Andreux, P. A., Bastiaansen, J. W. M., Wang, X., Kachman, S. D., Auwerx, J., Williams, R. W., Benson, A. K., Peterson, D. A., Ciobanu, D. C. (2012).** Murine Gut Microbiota Is Defined by Host Genetics and Modulates Variation of Metabolic Traits. *PLoS One*, 7(6), e39191.
- Miller, E. A., Livermore, J. A., Alberts, S. C., Tung, J., Archie, E. A. (2017).** Ovarian cycling and reproductive state shape the vaginal microbiota in wild baboons. *Microbiome*, 5(1), 8.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M. C., Clavel, T., Koebnick, C., Zunft, H.-J. F., Dore, J., Blaut, M. (2006).** Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1027–1033.
- Nasidze, I., Li, J., Quinque, D., Tang, K., Stoneking, M. (2009).** Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*, 19(4), 636–643.
- Nelson, D. E., Van Der Pol, B., Dong, Q., Revanna, K. V., Fan, B., Easwaran, S., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Diao, L., Fortenberry, J. D. (2010).** Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PLoS One*, 5(11), e14116.
- Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J., Foster, J. A. (2011).** Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(3), 255–e119.
- Nguyen, N.-P., Warnow, T., Pop, M., White, B. (2016).** A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2(1), 16004.
- Noguchi, K., Tsukumi, K., Urano, T. (2003).** Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comparative Medicine*, 53(4), 404–12.
- Novotny, M. V. (2003).** Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 1), 117–22. 7
- Oh, J., Conlan, S., Polley, E. C., Segre, J. A., Kong, H. H. (2012).** Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Medicine*, 4(10), 77.
- O’Hanlon, D. E., Moench, T. R., Cone, R. A. (2013).** Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. *PLoS One*, 8(11), e80074.
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B. W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T. A., Lulis, A. J. (2016).** Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes*, 7(4), 313–322.
- Pearce, M. M., Hilt, E. E., Rosenfeld, A. B., Zilliox, M. J., Thomas-White, K., Fok, C., Kliethermes, S., Schreckenberger, P. C., Brubaker, L., Gai, X., Wolfe, A. J. (2014).** The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *mBio*, 5(4), e01283–14.
- Petersson, J., Carlström, M., Schreiber, O., Phillipson, M., Christoffersson, G., Jägare, A., Roos, S., Jansson, E. Å., Persson, A. E. G., Lundberg, J. O., Holm, L. (2009).** Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(8), 1068–1075.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., Forney, L. J. (2011).** Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(Supplement_1), 4680–4687.
- Ren, W., Chen, S., Zhang, L., Liu, G., Hussain, T., Hao, X., Yin, J., Duan, J., Tan, B., Wu, G., Bazer, F. W., Yin, Y. (2016).** Interferon Tau Affects Mouse Intestinal Microbiota and Expression of IL-17. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2839232.
- Rhee, S. H., Pothoulakis, C., Mayer, E. A. (2009).** Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 6(5), 306–314.
- Rodrigue, L., Barras, M. J., Marcotte, H., Lavoie, M. C. (1993).** Bacterial colonization of the oral cavity of the BALB/c mouse. *Microbial Ecology*, 26(3), 267–75.
- Rodrigue, L. a Lavoie, M. C. (1996).** Comparison of the proportions of oral bacterial species in BALB/c mice from different suppliers. *Laboratory Animals*, 30(2), 108–113.

- Rodrigue, L., Marion, D., Trudel, L., Barthe, C., Lavoie, M. C. (1989).** Comparison of methods for the evaluation of the oral microbiota of mice. *Journal of Microbiological Methods*, 10(2), 71–82.
- Roediger, W., W. E. (1982).** The effect of bacterial metabolism on the nutrition and function of the colon mucosa : a symbiosis between man and bacteria. *Colon and Nutrition*, 11–26.
- Round, J. L. a Mazmanian, S. K. (2010).** Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12204–12209.
- Sakata, T. (1987).** Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *British Journal of Nutrition*, 58(01), 95–103.
- Salyers, A. A., Palmer, J. K., Wilkins, T. D. (1978).** Degradation of polysaccharides by intestinal bacterial enzymes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31(10), S128–S130.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016).** Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8), e1002533.
- Shannon, C. E. (1948).** A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(4), 623–656.
- Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. (2010).** Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 20051–20056.
- Shipitsyna, E., Roos, A., Dacu, R., Hallén, A., Fredlund, H., Jensen, J. S., Engstrand, L., Unemo, M. (2013).** Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age - sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One*, 8(4), e60670.
- Siddiqui, H., Nederbragt, A. J., Lagesen, K., Jeansson, S. L., Jakobsen, K. S. (2011).** Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiology*, 11, 244.
- Shaw, L., Ribeiro, A. L. R., Levine, A. P., Pontikos, N., Balloux, F., Segal, A. W., Roberts, A. P., Smith, A. M. (2017).** The Human Salivary Microbiome Is Shaped by Shared Environment Rather than Genetics: Evidence from a Large Family of Closely Related Individuals. *mBio*, 8(5), e01237–17.
- Skarin, A. a Sylwan, J. (1986).** Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, 94(6), 399–403.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., Garrett, W. S. (2013).** The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573.
- Soliman, F., Glatt, C. E., Bath, K. G., Levita, L., Jones, R. M., Pattwell, S. S., Jing, D., Tottenham, N., Amso, D., Somerville, L. H., Voss, H. U., Glover, G., Ballon, D. J., Liston, C., Teslovich, T., Van Kempen, T., Lee, F. S., Casey, B. J. (2010).** A Genetic Variant BDNF Polymorphism Alters Extinction Learning in Both Mouse and Human. *Science*, 327(5967), 863–866.
- St. Leger, A. J., Desai, J. V., Drummond, R. A., Kugadas, A., Almaghrabi, F., Silver, P., Raychaudhuri, K., Gadjeva, M., Iwakura, Y., Lionakis, M. S., Caspi, R. R. (2017).** An Ocular Commensal Protects against Corneal Infection by Driving an Interleukin-17 Response from Mucosal $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity*, 47(1), 148–158.e5.
- Staudinger, T., Pipal, A., Redl, B. (2011).** Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), 1381–1389.
- Stopka, P., Kuntová, B., Klempt, P., Havrdová, L., Černá, M., Stopková, R. (2016).** On the saliva proteome of the Eastern European house mouse (*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity. *Scientific Reports*, 6(1), 32481.
- Stopkova, R., Klempt, P., Kuntova, B., Stopka, P. (2017).** On the tear proteome of the house mouse (*Mus musculus musculus*) in relation to chemical signalling. *PeerJ*, 5, e3541.
- Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J., Leulier, F. (2011).** *Lactobacillus plantarum* Promotes *Drosophila* Systemic Growth by Modulating Hormonal Signals through TOR-Dependent Nutrient Sensing. *Cell Metabolism*, 14(3), 403–414.
- Stoyancheva, G., Marzotto, M., Dellaglio, F., Torriani, S. (2014).** Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Archives of Microbiology*, 196(9), 645–653.
- Sturgeon, A., Stull, J. W., Costa, M. C., Weese, J. S. (2013).** Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4), 891–898.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Kubo, C., Koga, Y. (2004).** Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of Physiology*, 558(1), 263–275.

- Swartz, J. D., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R. W., Berardinelli, J. G., Hatfield, P. G., Thomson, J. M., Roberts, A., Yeoman, C. J. (2014). Characterization of the Vaginal Microbiota of Ewes and Cows Reveals a Unique Microbiota with Low Levels of Lactobacilli and Near-Neutral pH. *Frontiers in Veterinary Science*, 1, 19.
- Tannenbaum, S. R., Sinskey, A. J., Weisman, M., Bishop, W. (1974). Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(1), 79–84.
- Theis, K. R., Schmidt, T. M., Holekamp, K. E. (2012). Evidence for a bacterial mechanism for group-specific social odors among hyenas. *Scientific Reports*, 2(1), 615.
- Theis, K. R., Venkataraman, A., Dycus, J. A., Koonter, K. D., Schmitt-Matzen, E. N., Wagner, A. P., Holekamp, K. E., Schmidt, T. M. (2013). Symbiotic bacteria appear to mediate hyena social odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49), 19832–7.
- Theriot, C. M., Koenigsknecht, M. J., Carlson, P. E., Hatton, G. E., Nelson, A. M., Li, B., Huffnagle, G. B., Z. Li, J., Young, V. B. (2014). Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature Communications*, 5(1), 3114.
- Tikhonov, G., Abrego, N., Dunson, D., Ovaskainen, O. (2017). Using joint species distribution models for evaluating how species-to-species associations depend on the environmental context. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(4), 443–452.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 782–7.
- Tress, B., Dorn, E. S., Suchodolski, J. S., Nisar, T., Ravindran, P., Weber, K., Hartmann, K., Schulz, B. S. (2017). Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease. *PLoS One*, 12(5), e0176736.
- Troccez, M., Gaña, N., Beccucci, S., Schrenzel, J., Cayeux, I., Starkenmann, C., Lazarevic, V. (2015). Mapping axillary microbiota responsible for body odours using a culture-independent approach. *Microbiome*, 3(1), 3.
- Trudel, L., St-Amand, L., Bareil, M., Cardinal, P., Lavoie, M. C. (1986). Bacteriology of the oral cavity of BALB/c mice. *Canadian Journal of Microbiology*, 32(8), 673–678.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480–484.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031.
- Uchihashi, M., Bergin, I. L., Bassis, C. M., Hashway, S. A., Chai, D., Bell, J. D. (2015). Influence of age, reproductive cycling status, and menstruation on the vaginal microbiome in baboons (*Papio anubis*). *American Journal of Primatology*, 77(5), 563–578.
- Van der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J. M., Lekkerkerk-van der Wees, J. E. C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *Journal of Hygiene*, 69(03), 405–411.
- Vásquez, A., Jakobsson, T., Ahrné, S., Forsum, U., Molin, G. (2002). Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2746–9.
- Vellai, T. a Vida, G. (1999). The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1428), 1571–1577.
- Walmer, D. K., Wrona, M. A., Hughes, C. L., Nelson, K. G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 131(3), 1458–66.
- Walsh, M. M. a Lowe, D. R. (1985). Filamentous microfossils from the 3, 500-Myr-old Onverwacht Group, Barberton Mountain Land, South Africa. *Nature*, 314(6011), 530–532.
- Wang, J., Linnenbrink, M., Künzel, S., Fernandes, R., Nadeau, M.-J., Rosenstiel, P., Baines, J. F. (2014). Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), E2703–10.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267.
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., Ding, K. (2012). Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 7042–7047.
- Webb, A. J., Patel, N., Loukogeorgakis, S., Okorie, M., Aboud, Z., Misra, S., Rashid, R., Miall, P., Deanfield, J., Benjamin, N., MacAllister, R., Hobbs, A. J., Ahluwalia, A. (2008). Acute Blood Pressure Lowering, Vasoprotective, and Antiplatelet Properties of Dietary Nitrate via Bioconversion to Nitrite. *Hypertension*, 51(3), 784–790.

- Weese, J., Slifierz, M., Jalali, M., Friendship, R. (2014). Evaluation of the nasal microbiota in slaughter-age pigs and the impact on nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 69.
- Weldon, L., Abolins, S., Lenzi, L., Bourne, C., Riley, E. M., Viney, M. (2015). The Gut Microbiota of Wild Mice. *PLoS One*, 10(8), e0134643.
- Wen, X., Miao, L., Deng, Y., Bible, P. W., Hu, X., Zou, Y., Liu, Y., Guo, S., Liang, J., Chen, T., Peng, G.-H., Chen, W., Liang, L., Wei, L. (2017). The Influence of Age and Sex on Ocular Surface Microbiota in Healthy Adults. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(14), 6030–6037.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579.
- Wolfe, A. J., Toh, E., Shibata, N., Rong, R., Kenton, K., Fitzgerald, M., Mueller, E. R., Schreckenberger, P., Dong, Q., Nelson, D. E., Brubaker, L. (2012). Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1376–83.
- Yang, X., Cheng, G., Li, C., Yang, J., Li, J., Chen, D., Zou, W., Jin, S., Zhang, H., Li, D., He, Y., Wang, C., Wang, M., Wang, H. (2017). The normal vaginal and uterine bacterial microbiome in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Microbiological Research*, 199, 1–9.
- Yamada, S., Baba, E., Arakawa, A. (1983). Proliferation of *Pasteurella pneumotropica* at oestrus in the vagina of rats. *Laboratory Animals*, 17(4), 261–266.
- Yildirim, S., Yeoman, C. J., Janga, S. C., Thomas, S. M., Ho, M., Leigh, S. R., Consortium, P. M., White, B. A., Wilson, B. A., Stumpf, R. M. (2014). Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal *Lactobacillus* dominance. *The ISME Journal*, 8(12), 2431–2444.
- Yurkovetskiy, L., Burrows, M., Khan, A. A., Graham, L., Volchkov, P., Becker, L., Antonopoulos, D., Umesaki, Y., Chervonsky, A. V. (2013). Gender Bias in Autoimmunity Is Influenced by Microbiota. *Immunity*, 39(2), 400–412.
- Zaura, E., Keijsers, B. J., Huse, S. M., Crielaard, W. (2009). Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, 9(1), 259.
- Zhang, X., Harper, R., Karsisto, M., Lindstrom, K. (1991). Diversity of Rhizobium Bacteria Isolated from the Root Nodules of Leguminous Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), 104–113.
- Zhou, X., Bent, S. J., Schneider, M. G., Davis, C. C., Islam, M. R., Forney, L. J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*, 150(8), 2565–2573.