

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Štěpán Balatka

**Vliv komerčních probiotických preparátů na složení střevního mikrobiomu člověka**

Influence of commercial probiotic preparations on human intestinal microbiome  
composition

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.

Praha 2021

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 10.6. 2021

Podpis:.....

## Abstrakt

Střevní mikroflóra je rozsáhlý ekosystém mikroorganismů, který tvoří symbiotické i patogenní druhy. Mikroflóra plní řadu důležitých funkcí v lidském organismu. Nezpochybnitelnou funkcí je vliv na zdravotní stav hostitele. Pro zdravý mikrobiom obecně platí, čím vyšší je biodiverzita, tím vyšší je prospěšnost. Hlavním předpokladem ovšem je, že se nejedná o vysokou rozmanitost patogenních bakteriálních druhů. Mikrobiom tvoří mnoho „prospěšných“ druhů zejména z čeledi *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. V posledních desetiletích narůstá popularita doplňování těchto „prospěšných“ druhů pomocí různých doplňků stravy (např. probiotika). Předkládaná diplomová práce se zabývá pilotní studií vlivu kapalných komerčních probiotických preparátů od americké firmy Ascended Health (nedostupné na českém trhu) na lidský mikrobiom.

Studie se zúčastnilo 9 dobrovolníků, kteří poskytli 70 fekálních vzorků odebraných v čase před užitím, během užívání a po užití zkoumaných preparátů. Pro zjištění biodiverzity střevních bakteriálních druhů byly použity dvě metody, obě založené na identifikaci pomocí bakteriální DNA kódující gen pro 16S rRNA. První metoda využívá techniku PCR-DGGE a poté identifikaci pomocí Sangerova sekvenování. Druhá metoda je založena na přípravě knihovny pro sekvenování nové generace. Vyhodnocení a analýza biodiverzity byla provedena v počítačovém programu QIIME 2. Diverzita mezi vzorky byla určena na základě počtu operačních taxonomických jednotek. Vedle biodiverzity byly sledovány změny v relativním zastoupení nejpočetnějších bakteriálních čeledí a čeledí dodávaných v probioticích.

Ačkoli výsledky studie nejsou zcela jednoznačné, lze je shrnout tak, že během užívání probiotických preparátů došlo u 6 dárců ke zvýšení biodiverzity střevních bakteriálních druhů. Po ukončení užívání se biodiverzita u těchto dárců začala vracet do stavu před užitím. Nejpočetněji zastoupené čeledi ve fekálních vzorcích jsou *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*. Relativní zastoupení těchto tří čeledí nebylo ovlivněno užíváním probiotik. Provedené analýzy neprokázaly změnu v relativním zastoupení probiotických bakteriálních čeledí ve fekálních vzorcích odebraných během užívání a po ukončení užívání komerčních probiotických preparátů.

**Klíčová slova:** střevní mikroflóra, 16S rRNA, komerční probiotika, biodiverzita

# Abstract

The intestinal microflora is an extensive ecosystem of microorganisms that consists of symbiotic and pathogenic species. The microflora is responsible for many important functions in the human body. An unquestionable function is that it affects the health state of the host. The higher the biodiversity, the greater the benefit for the host. However, it is necessary to point out that this should not include a high diversity of pathogenic bacterial species. There are many "beneficial" species, especially from the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* families. In recent decades, the popularity of supplementing these "beneficial" species with various supplementary diets (e.g. probiotics) has been growing a lot. The presented diploma thesis deals with pilot studies of liquid commercial probiotic preparations from American companies Ascended Health (not available on the Czech market) and their effects on the human microbiome.

The study involved 9 volunteers who provided 70 fecal samples before, during, and after use of the studied products. Two methods were used to determine the biodiversity of intestinal bacterial species. Both are based on the identification by bacterial DNA that encodes gene 16S rRNA. The first method uses PCR-DGGE technique and then identification by Sanger sequencing. The second method is based on preparation of a library for next generation sequencing. The evaluation and the analysis of biodiversity was performed in the PC programme QIIME 2. The differences between the samples were determined based on the number of operational taxonomic unit. The study also monitors changes in the relative frequency of the most bacterial families and families supplied in probiotics.

Even though the study results are not always conclusive, it can be said, however, that the use of probiotic preparations increased the biodiversity of intestinal bacterial species of 6 donors. The biodiversity of these donors began to return to pre-use state after discontinuation of the probiotics. The most abundant families in faecal samples are *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*, the relative abundance of which was not affected by the use of probiotics. The analyzes did not show any change in the relative abundance of probiotic bacterial families in faecal samples during and after the use of commercial probiotic preparations.

Key words: intestinal microflora, 16S rRNA, commercial probiotics, biodiversity

[IN CZECH]

### **Poděkování:**

V první řadě bych chtěl poděkovat panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho odborné vedení, vstřícnost, ochotu, volnost při výběru tématu a dále za jeho trpělivost a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Velké díky patří Ing. Chahrazed Mekadim, MSc., PhD. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i, za odborné vedení a dohled během práce, pomoc s experimentální a vyhodnocovací fází, za mnoho cenných rad a veškerý její čas, který mi obětovala. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Jakubu Mrázkovi, PhD. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i, za to, že mi umožnil pracovat na tomto tématu a za finanční podporu celého projektu. Poděkování patří i všem dárcům, kteří poskytli vzorky ke studii.

# Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	10
1.1 Mikroflóra gastrointestinálního traktu	10
1.2 Střevní mikroflóra	12
1.2.1 Bakteriální složení normální střevní mikroflóry	15
1.2.2 Funkce střevní mikroflóry	16
1.2.3 Metody využívané pro studium střevní mikroflóry	19
1.3 Probiotika	21
1.3.1 Vybrané mechanismy účinku probiotik	23
1.3.2 Komerční probiotické přípravky	24
1.3.2.1 Probiotika firmy Ascended Health	25
1.3.2.2 Probiotika dostupná na českém trhu	26
1.3.3 Ostatní probiotika	26
1.4 Prebiotika a vláknina	27
2 Cíl práce	29
3 Materiál a metody	30
3.1 Materiál	30
3.1.1 Chemikálie	30
3.1.2 Účastníci studie	32
3.1.3 Přístroje	35
3.2 Metody	37
3.2.1 Izolace bakteriální DNA z lidských fekálních vzorků	37
3.2.2 PCR-DGGE analýza fekálních bakterií	38
3.2.2.1 PCR amplifikace genu pro 16S rRNA	38
3.2.2.2 Kontrola amplifikace DNA	39
3.2.2.3 Příprava polyakrylamidového gradientového gelu a DGGE analýza	40

3.2.2.4	Příprava a purifikace DGGE vzorků pro Sangerovo sekvenování .....	41
3.2.3	Analýzu mikrobiální diverzity za použití „Next generation sequencing“ .....	43
3.2.3.1	Příprava PCR amplikonů.....	43
3.2.3.2	Příprava knihovny pro NGS .....	44
3.2.3.3	Příprava templátu pro NGS .....	48
3.2.3.4	Sekvenování připraveného templátu.....	50
4	Výsledky .....	52
4.1	Kontrolní agarosová elektroforéza.....	52
4.2	Vliv komerčních probiotických preparátů na biodiverzitu střevní mikroflóry zkoumaný metodou DGGE.....	53
4.3	Sangerovo sekvenování zvolených zón DGGE gelu .....	56
4.4	Relativní zastoupení bakteriálních čeledí ve střevním mikrobiomu dárců .....	56
4.5	Vliv probiotik na biodiverzitu střevního mikrobiomu zkoumaný na základě metody NGS.....	72
5	Diskuse.....	76
6	Souhrn.....	82
	Seznam literatury .....	83
	Příloha 1: Procentuální zastoupení všech nalezených bakteriálních druhů v lidských fekálních vzorcích .....	97
	Příloha 2: Diagramy PCoA znázorňující bakteriální biodiverzitu mezi vzorky souboru..	115

## Seznam zkratek

CFU	jednotky tvořící kolonii (z angl. „colony forming unit“)
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza (z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“)
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DS	doplňěk stravy
dsDNA	dvouvláknová DNA (z angl. „double-stranded DNA“)
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA)
GIT	gastrointestinální trakt
HSV	z angl. „herpes simplex virus“
ISP	z angl. „ion sphere particles“
KPP	komerční probiotický preparát
NCBI	z angl. „National Center for Biotechnology Information“
NGS	sekvenování nové generace (z angl. „next generation sequencing“)
OTU	operační taxonomická jednotka (z angl. „operational taxonomic unit“)
PCoA	analýza hlavních koordinát (z angl. „principal coordinate analysis“)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. „polymerase chain reaction“)
QIIME 2	z angl. „Quantitative Insights Into Microbial Ecology“
qPCR	kvantitativní PCR



SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z angl. „short chain fatty acid“)
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. „single-stranded DNA“)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TAE	Tris-acetátový pufr
TBE	Tris-borátový pufr

# 1 Úvod

Komerčně dostupné probiotické preparáty jsou v dnešní době běžným doplňkem stravy velkého množství světové populace. Jsou využívána zejména pro podporu imunity a po léčbě antibiotiky. Na světovém trhu se nachází celá řada různých typů probiotik a vybrat ty správné může být problém. Pro užívání probiotik se nabízí mnoho otázek. „Je skutečně správné využívat komerční probiotické preparáty?“ „Jsou skutečně tak prospěšné, jak uvádí výrobce?“ „Jak vybrat správný (cenově přijatelný, dostatečně účinný) přípravek?“ „Nestačilo by střevní mikroflóru doplňovat a obnovovat konzumací přirozených potravin?“

Vedle mikroorganismů obsažených v probiotikách se přirozeně v lidském těle nachází komplexní ekosystém mikroorganismů. Organismus v průběhu života přichází do kontaktu s miliony symbiotických i patogenních mikroorganismů. Na osídlení organismu mikroorganismy působí velké množství vnitřních a vnějších vlivů. Mikroorganismy pokrývají kůži, jsou přítomné uvnitř ústní dutiny, v dýchacích cestách, v močových cestách, či v ženské pochvě. Jedna z nejpočetnějších a zároveň nejzajímavějších mikroflór se nachází ve střevech. Tato práce je zaměřena především na interakci střevní mikroflóry s podávanými komerčními probiotickými preparáty (KPP) americké firmy Ascended Health.

## 1.1 Mikroflóra gastrointestinálního traktu

Lidský gastrointestinální trakt (GIT) je komplexní systém, který začíná ústní dutinou, pokračuje přes žaludek do střev a končí konečníkem. Gastrointestinální trakt poskytuje povrch 150–200 m<sup>2</sup>, který může být kolonizován a přechodně obsazen různými mikroby [1]. Mikroflóra obývající celý GIT je nesmírně rozsáhlým a složitým ekosystémem. Skládá se z aerobních i anaerobních mikroorganismů [2]. Napříč celým GIT je pozorován obrovský rozdíl v hustotě osídlení a složení mikroflóry [1]. V horní části GIT, v žaludku a tenkém střevě se nachází nižší počty bakterií, důvodem je nižší hodnota pH a kratší doba průchodu potravy. Nejvyšší biodiverzita bakterií je v prostředí tlustého střeva, kde je nízká rychlost buněčného obratu, nízký redoxní potenciál a doba průchodu je dlouhá [3]. Vliv na složení populací v jednotlivých částech GIT má především vnitřní prostředí daného místa a jeho funkce, kterou zajišťuje v této části GIT. Pro zachování správných funkcí GIT má pro hostitele zásadní význam složení jeho střevní mikroflóry. Bakterie přítomné v GIT plní hned několik funkcí: produkují vitaminy, absorbují ionty (Ca, Mg, Fe), chrání před patogeny, posilují imunitní systém, fermentují „nestravitelné části potravin“ na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA, z angl. „short chain fatty acid“) a na další metabolity [1,4,5].

Místem vstupu do GIT je ústní dutina. Potrava je zde mechanicky drcena na malé části, což zvětšuje její povrch pro pozdější zpracování. Dochází zde ke štěpení sacharidů a k jejich vstřebání. Aktivita v ústní dutině může mít velký vliv na trávení potravy v dolní části GIT. Orální mikrobiom se skládá z přechodných a komenzálních bakteriálních populací, které často tvoří biofilmy na povrchu dutiny [6]. Provedené analýzy ukazují, že nejběžněji se vyskytujícím rodem je *Streptococcus*, dalšími ne vždy přítomnými rody jsou *Neisseria*, *Gamella* nebo *Veillonella* [7]. Z bližších pozorování se zdá, že přítomnost jednotlivých taxonů závisí na interakcích mezi mikroby v rámci komunity. Například druhy *Streptococcus oralis* a *Streptococcus gordonii* mají nízkou metabolickou komplementaritu a vysokou metabolickou konkurenci, a proto jsou vzájemnými antagonisty [8]. Další přítomný druh *Porphyromonas gingivalis* má naopak vysokou metabolickou komplementaritu, a tak může symbioticky růst s jinými taxony orální mikroflóry [1].

Žaludek je hlavním místem v GIT, kde dochází k trávení. Potrava je zde mísená s proteolytickými enzymy a žaludečními kyselinami, které napomáhají rozpadu a následné absorpci živin. Kyselé prostředí má také ochrannou funkci před patogeny. Vzhledem k velmi kyselým podmínkám ( $\text{pH} < 4$ ) je v žaludku inhibován růst mnoha běžných bakterií. Z pohledu osídlení mikroorganismy je žaludek jedinečným místem. Počet přítomných mikrobů je uváděn v rozmezí  $10^1$  až  $10^3$  bakterií na gram obsahu [1,9]. Prováděné studie odhalily, že existují dvě hlavní skupiny lidí, s a bez *Helicobacter pylori* (někteří jedinci mají nižší zastoupením *Helicobacter pylori*) [10]. Jedinci s dominancí *Helicobacter pylori* v mikrobiomu měli významně zvýšený podíl kmene *Proteobacteria*. *Helicobacter pylori* je v současné době velmi studovaným bakteriálním druhem. Často bývá spojován s gastritidou, peptickými vředy a rakovinou žaludku. I přes tuto skutečnost je tento druh v určité míře považován za zdraví prospěšný [11]. Dále se v prostředí žaludku běžně vyskytují rody *Streptococcus* a *Prevotella*.

Na žaludek navazují střeva, kde dochází k trávení a k absorpci živin. Do dvanáctníku tenkého střeva se produkují žlučové kyseliny a pankreatické enzymy, které se podílejí na trávení potravy. Epiteliální buňky v jejunu a ileu umožňují absorpci živin, především glukosy za využití glukosových transportérů a sodíkových iontů. Tenké střevo pokračuje do tlustého střeva, které je kratší a má větší průměr. Zde dochází především k absorpci vody a minerálních látek [1].

Pro studium mikroflóry tenkého a tlustého střeva se nejčastěji používají fekální vzorky. Pro přesnou charakterizaci tenkého střeva jsou ovšem nevhodné, a proto se ve speciálních případech používá biopsie tenkého střeva [12]. Nejčastěji detekovanými bakteriálními rody jsou *Clostridium*, *Streptococcus* a *Bacteroides* [13]. Problematice mikroflóry střeva je věnována kapitola 1.2.

## 1.2 Střevní mikroflóra

Je známo, že prakticky všechny mnohobuněčné organismy žijí ve velmi úzkém vztahu s okolními mikroby a lidský organismus není žádnou výjimkou. Lidské tělo obývají v obrovském množství bakterie, archea, viry, houby a protozoa, kteří ovlivňují metabolické a imunitní funkce organismu [14,15]. Je odhadováno, že lidská mikrobiota obsahuje téměř  $10^{14}$  bakteriálních buněk, což je asi 10krát víc, než je v těle přítomných lidských buněk, pokud nejsou uvažovány buňky krve. Právě GIT je nejvíce kolonizovaným systémem. V samotném tlustém střevě se odhaduje výskyt více než 70 % všech mikrobů v lidském těle. Tato skutečnost je podpořena přítomností celé řady molekul (např. nestravitelné části potravy), které mohou být využity jako živiny mikroorganismů obsažených právě v tlustém střevě [15].

Zájem o střevní mikroflóru a studie s ním spojené v posledních desetiletích exponenciálně rostou [16]. Mnoho studií prokázalo značný vliv střevní mikroflóry na ovlivnění zdravotního stavu hostitele a progresi celé řady onemocnění. U zdravých jedinců udržuje osidlující mikroflóra se svým hostitelem mutualistický vztah, který je prospěšný oběma partnerům [1]. Také je známo, že prostřednictvím střevní mikroflóry dochází k rozvoji mnoha gastrointestinálních nemocí (např. zánětlivé onemocnění střev, kolorektální karcinom). Zároveň má střevní mikroflóra souvislost s řadou nemocí týkajících se jiných systémů. Mezi tyto choroby patří například onemocnění jater, psychické poruchy, metabolické nemoci, autoimunitní onemocnění nebo infekční nemoci [17]. Některé prováděné epidemiologické studie ukázaly, že střevní mikroflóra může hrát potencionální roli pro určení účinnosti imunoterapie během léčby rakoviny [18].

Na střevní mikroflóru, a především na její složení má vliv celá řada vnějších a vnitřních faktorů [19]. Významnými faktory ovlivňujícími zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů a jejich množství jsou věk, váha, pohlaví, strava, zdravotní stav, užívané léky (např. léčba pomocí antibiotik [20]), styl života, okolní prostředí, stres, ale i genetická výbava předaná od rodičů [21,22].

Prováděné studie odhalily, že mikroflóra každého jedince se formuje už během těhotenství v těle matky, kdy je plod vystavován například bakteriím přítomným v placentě [23]. První velká kolonizace těla mikroorganismy přichází po narození jedince. Tělo novorozence je osídleno podle způsobu porodu [24]. U novorozenců narozených běžnou cestou dochází ke kontaktu nejprve s vaginální mikroflórou matky a až poté s vnějším prostředím. Takto narozené děti mají ve střevní mikroflóře vyšší zastoupení rodů *Lactobacillus* a *Prevotella*. U novorozenců narozených císařským řezem je osídlení těla mikroorganismy odlišné a chudší. Novorozenec přichází do kontaktu s kožní mikroflórou matky a v jeho střevě dominují rody *Streptococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium* [25]. Během prvních týdnů života dochází k masivnímu a dynamickému vývoji mikroflóry, která se postupně stabilizuje. Zhruba ve věku 3 let je střevní mikroflóra z 40–60 % podobná dospělému mikrobiomu [26]. Během kojeneckého období řídí vývoj mikroflóry především výživa (mateřské mléko, umělá kojenecká výživa). Další vliv na složení mikroflóry má období puberty a hormonální změny s ní spojené [24]. Malé děti a jedinci v období puberty vykazují významný rozdíl v podílech *Bacteroides* a *Bifidobacterium* ve srovnání s dospělými [27,28]. U dospělých jedinců je mikroflóra poměrně stabilní, ovšem ne absolutně. I během života se mění v závislosti na vnějších a vnitřních faktorech a nemocech. Dalšími faktory, které ovlivňují kolonizaci těla mikroorganismy v raném stádiu života jsou užívání antibiotika, prostředí do kterého se jedinec narodí, přítomnost sourozenců nebo domácích mazlíčků [24].

Z velké části se na složení střevní mikroflóry podílí strava. Hned po způsobu porodu má v počátcích života obrovský význam strava kojence. Kojenci vyživovaní mateřským mlékem mají ve střevě velký podíl rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, u kojenců živěných umělou výživou dominují rody *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridia* a *Streptococcus*. Bakteriální složení střevního mikrobiomu se podílí na vytváření vrozené imunity během vývoje. Abnormální bakteriální kolonizace způsobená umělou kojeneckou výživou může mít za následek řadu dětských onemocnění v důsledku špatné imunity [29,30]. Rod *Bifidobacterium* fermentuje dietní oligosacharidy na SCFA (př. butyrát), které modulují imunitní systém hostitele tak, aby produkoval IgG a podporují vznik vrozené imunity [31]. Po celou dobu dospělosti zůstává strava jedním z nejdůležitějších určujících činitelů při formování složení, biodiverzity a bohatosti bakteriálních druhů přítomných ve střevní mikroflóře. Obecně je příjem stravy bohaté na ovoce, zeleninu a vlákninu spojován s vyšší rozmanitostí střevní mikroflóry. Jedinci

konzumující tento typ stravy mají v mikrobiomu vyšší výskyt kmene *Firmicutes* [31,32]. Studie ukázaly, že po 4denním podávání živočišné stravy dojde ke snížení množství *Firmicutes*. To naznačuje, že i velmi krátké dietní manipulace mohou mít podstatný dopad na střevní mikroflóru [33]. Jiná práce autorů De Filippo a kol. [34] zase porovnává střevní mikroflóru u skupiny evropských a venkovských afrických dětí a jejich sklony k obezitě. Prováděné sekvenování fekálních vzorků odhalilo přítomnost 4 hlavních bakteriálních kmenů (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*). Ve vzorcích od evropských dětí bylo pozorováno vyšší relativní zastoupení *Firmicutes* a *Proteobacteria*, zatímco africké děti měly vyšší relativní zastoupení *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. U evropských dětí byl pozorován více než dvakrát vyšší poměr mezi kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, což naznačuje dramaticky odlišnou bakteriální kolonizaci střeva u obou populací, nezávislou přímo na typu stravy. Je známo, že poměr *Firmicutes* : *Bacteroidetes* se liší u obézních a štíhlých lidí. Tento poměr klesá s úbytkem hmotnosti při nízkokalorické stravě [35]. Vzhledem k oběma zjištěním se dá předpokládat, že zvýšený poměr *Firmicutes* : *Bacteroidetes* u evropských dětí může mít souvislost se sklony k obezitě. Navíc konzumace stravy západního typu (bohatá na živočišné bílkoviny, cukry, škrob a chudá na vlákninu) zvyšuje riziko obezity [34].

Studie autorů Turnbaugh a kol. [36] se zaměřila na vliv genotypu a sdíleného prostředí na střevní mikrobiom. Studie se zúčastnilo několik párů dospělých monozygotních a dizygotních dvojčat a jejich matky. Výsledky studie dokázaly, že střevní mikrobiom je sdílen mezi členy rodiny a na složení má vliv i genetická informace předaná od rodičů. U obou párů dvojčat nebyly pozorovány výrazné odlišnosti v kompozici střevního mikrobiomu. U monozygotních dvojčat byl ovšem rozdíl menší.

Jedním z nejvýznamnějších faktorů, majících vliv na střevní mikroflóru, je zdravotní stav jedince a léky, které užívá. Existuje obrovské množství studií se zaměřením na lidskou střevní mikroflóru v kombinaci s různými nemocemi. Z pohledu užívaných léčiv je velmi důležitý dopad antibiotik na střevní mikroflóru. Vedle pozitivního účinku při léčbě onemocnění mohou antibiotika narušit vzájemnou interakci mezi střevní mikroflórou a hostitelem a způsobit akutní onemocnění, či přispět k chronickým zdravotním problémům [37]. Důsledkem léčby antibiotiky mohou být akutní průjmy nebo i život ohrožující pseudomembranózní kolitida [38,39]. Z pohledu chronických stavů se může jednat o astma nebo atopická onemocnění. Tato onemocnění bývají spojována s užíváním antibiotik v dětství a změnou střevní mikroflóry [40,41]. Ve studii autorů Dethlefsen a kol. [37] byly

sledovány účinky antibiotik (ciprofloxacin) na střevní mikrobiom tří zdravých jedinců. Dárci poskytli vzorky před užíváním antibiotik a po ukončení užívání. Výsledkem bylo zjištění, že mikrobiota před a po užívání antibiotik si je podobná u všech jedinců na úrovni rodu, ale jsou pozorovány interindividuální rozdíly na nižší úrovni. Antibiotikum snižovalo rozmanitost bakteriálních taxonů přibližně na jednu třetinu. Zhruba po 4 týdnech od vysazení antibiotik došlo k návratu rozmanitosti na původní úroveň před užitím antibiotik. Existuje ale řada studií [37,42,43], které poukazují na dlouhodobý dopad některých antibiotik na střevní mikroflóru. Pro předcházení komplikacím, spojeným s užitím antibiotik, se v dnešní době podporuje obnova zdravé mikroflóry současným užíváním probiotik, jak uvádí paní profesorka Tlaskalová-Hogenová na webových stránkách Společnosti pro probiotika a prebiotika o.s. [44]. Užívání probiotik je věnována kapitola 1.3 (str. 21).

### 1.2.1 Bakteriální složení normální střevní mikroflóry

Střevní mikroflóra je tvořena převážně bakteriemi. Běžně se udává, že střevní mikroflóru tvoří několik tisíc bakteriálních druhů [14]. Objevila se i studie, které odhaduje kolektivní lidskou střevní mikroflóru až na 35000 bakteriálních druhů [45]. Hlavní zastoupení ve střevní mikroflóře mají anaerobní druhy. Například tlusté střevo je osídleno z 99,9 % právě anaerobními bakteriemi. Zbytek tvoří bakterie aerobní [46]. Anaerobními bakteriemi střevní mikroflóry jsou fakultativní a striktní druhy. Nejvíce zastoupenými anaerobními rody jsou *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Bacteroides* [47].

Obecně mezi převládající kmeny obývající prostředí tlustého střeva patří *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Poměr mezi těmito dvěma kmeny se významně podílí na predispozicích k chorobným stavům jedince [35]. Ovšem není to jediný faktor z pohledu bakteriálního složení, který by měl vliv na projevení choroby. V malé míře se v prostředí střev vyskytují i primárně patogenní druhy jako jsou například *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* a *Bacteroides fragilis*. Pokud dojde ke zvýšení množství těchto druhů, vede to v mnoha případech k propuknutí chronického onemocnění. Méně významným kmenem je *Proteobacteria*, jehož druhy jsou zastoupeny v nízkém množství. Nízká hojnost tohoto kmene, a zároveň vysoké zastoupení rodů *Bacteroides*, *Prevotella* a *Ruminococcus* přispívají k zdravému střevnímu mikrobiomu [31,48].

Na složení a rozmanitost střevního mikrobiomu mají významný dopad nemoci. Jak autoimunitní, tak neoplastická onemocnění, například zánětlivá onemocnění střev, cukrovka, obezita, kardiovaskulární onemocnění, různé alergie nebo rakovina [17].

Jednu z dalších metod pro charakterizaci normální střevní mikroflóry navrhlo konsorcium MetaHIT. Tento typ klasifikace bakteriálního složení je založen na třídění druhového složení do symbiotických typů podle vztahu mezi hostitelem a mikroby. Tyto typy byly pojmenovány jako enterotypy. Obecně existují tři enterotypy. Enterotyp 1 je charakterizován vysokým výskytem *Bacteroides* a vyskytuje se například společně s *Parabacteroides*. Bakterie patřící do enterotypu 1 využívají primárně energii z fermentace sacharidů a bílkovin. Bakterie z rodu *Bacteroides* mají široký sacharolytický potenciál. Využití těchto substrátů jako zdroje energie je způsobeno zvýšenou přítomností genů kódujících enzymy, kterými jsou hexoaminidasy, galaktosidasy a proteasy. Enterotyp 2 je charakterizován vysokým výskytem rodu *Prevotella*. Vyskytuje se společně s rodem *Desulfovibrio*, který v synergii pomáhá odbourávat mucinové glykoproteiny přítomné v slizniční vrstvě střeva. Rod *Prevotella* je významný mucinový degradátor, který využívá schopností rodu *Desulfovibrio*, který urychluje krok desulfatace mucinu. Enterotyp 3 je nejčastěji se vyskytujícím typem. Je typický vysokým výskytem rodu *Ruminococcus*, který se vyskytuje společně s rodem *Akkermansia*, jenž obsahuje druhy schopné degradovat mucin. Enterotyp 3 je spojován s membránovým transportem cukrů, což naznačuje efektivní vazbu mucinu, následně jeho hydrolýzu a absorpci cukrů bakteriemi. Dále byla u těchto enterotypů pozorována celá řada specifických metabolických funkcí. Například enterotyp 1 se vyznačuje syntézou biotinu, riboflavinu, pantothenátu a askorbátu. U enterotypu 2 převládá syntéza thiaminu a folátu. Nelze říct, který enterotyp je považován za „zdravý“ normalní mikrobiom [31,49]. Každý „zdravý“ mikrobiom musí být vyvážený a měl by dosahovat zvýšené biodiverzity bakteriálních druhů [50]. Fylogenetické a funkční rozdíly mezi enterotypy mají samozřejmě vliv na vzájemné vztahy mezi hostitelem a mikrobiomem [49].

### 1.2.2 Funkce střevní mikroflóry

Jak již bylo řečeno, střevní mikroflóra udržuje symbiotický vztah se střevní sliznicí a díky tomu zajišťuje pro zdravého jedince podstatné metabolické, imunologické a ochranné funkce. I z těchto důvodů je střevní mikroflóra považována za „orgán“ s rozsáhlou metabolickou schopností a funkční plasticitou [31]. Přestože je mikroflóra GIT, a zejména střevní mikrobiom, významně prostudovanou oblastí, stále existuje mnoho nepopsaných taxonů s neznámými funkcemi [1].

Jednou z hlavních funkcí střevní mikroflóry je její podíl na metabolismu živin. Nestravitelné oligosacharidy (př. vláknina) a sacharidy, které uniknou proximálnímu trávení,



jsou v tlustém střevě fermentovány za účasti anaerobních bakteriálních rodů *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium* a *Enterobacteria*. Výsledkem této fermentace je syntéza řady metabolitů, převážně SCFA. Významnými SCFA jsou butyrát, propionát a acetát. Ty jsou pro bakterie „odpadním“ produktem, ale pro hostitele mají obrovský význam v podobě substrátů zpracovávaných v mnoha metabolických drahách (např. metabolismus lipidů, glukosy, cholesterolu) [31,51,52]. Dále jsou signálními molekulami a bohatým zdrojem energie pro hostitele. Předpokládá se, že SCFA působí jako ligandy pro receptory (Gpr41) spřažené s G-proteiny [53]. Některé SCFA (např. butyrát) mohou vznikat přeměnou toxických vedlejších produktů (D-laktát) metabolismu. Tento proces zabraňuje hromadění těchto toxických látek v těle. Bylo zjištěno, že za účasti střevní mikroflóry a při pH 6,5 dochází k metabolismu laktátu právě na butyrát [54]. Dále bylo prokázáno, že střevní mikroflóra má pozitivní vliv na metabolismus lipidů. Například *Bacteroides thetaiotaomicron* zvyšuje účinnost hydrolýzy lipidů zvýšením exprese kolipasy, kterou potřebuje pankreatická lipasa pro trávení lipidů [55]. Některé druhy střevní mikroflóry obsahují aparát metabolizující proteiny na signální molekuly. Aminokyselinové transportéry na buněčné stěně bakterií usnadňují vstup aminokyselin ze střevního lumenu do bakterií. Uvnitř bakterií poté dochází ke konverzi na malé signální molekuly a antimikrobiální peptidy [31]. Mezi důležité příklady patří konverze L-histidinu na histamin nebo konverze glutamátu na kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou [56,57]. Další metabolickou funkcí střevní mikroflóry je syntéza vitamínu K a vitaminů B (B<sub>2</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>12</sub>) [58]. Zástupci rodu *Bacteroides* syntetizují konjugovanou kyselinu linolovou, která má antidiabetické, antiaterogenní, antiobesogenní, hypolipidemické a imunomodulační vlastnosti [59]. Střevní mikroflóra, zejména *Bacteroides intestinalis* a do určité míry také *Bacteroides fragilis* a *E. coli*, má schopnost dekonjugovat a dehydratovat primární žlučové kyseliny a přeměňovat je na sekundární žlučové kyseliny (deoxycholová a lithocholová). Dále bylo také prokázáno, že zdravá střevní mikroflóra zvyšuje koncentraci kyselin pyrohroznové, citronové, fumarové a jablečné v séru [60]. Další studie ukázaly podíl střevní mikroflóry na rozkladu různých polyfenolů přítomných v potravě. Polyfenolové sekundární metabolity se vyskytují v rostlinách, ovoci a produktech pocházejících z rostlin (čaj, kakao, víno). Mezi tyto látky patří například flavonoidy (flavony, flavonoly, flavanony, flavanonoly, isoflavony, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly (flavandioly) a anthokyaniny [61]), taniny, lignany a chlorogenové kyseliny. Polyfenoly jsou ve stravě obvykle neaktivní a vyskytují se zde ve formě glykosilovaných derivátů. Mikroflóra střeva zajišťuje biotransformaci těchto derivátů a po odštěpení cukerné složky vznikají aktivní sloučeniny. Ty jsou absorbovány

portální žilou a jsou transportovány do dalších tkání a orgánů, kde zajišťují antimikrobiální a další metabolické působení [62].

Studie střevního mikrobiomu prokázaly jeho vliv na metabolismus xenobiotik a léků. Působení mikrobů na metabolismus těchto látek může mít hluboký dopad na léčbu různých nemocí. Studie autorů Clayton a kol. [63] ukázala, že mikrobiální metabolit p-kresol může v důsledku kompetitivní inhibice jaterních sulfotransferas snižovat schopnost jater metabolizovat acetaminofen. Dalším příkladem metabolismu léčiv indukovaných střevním mikrobiomem je dekonjugace protinádorového léčiva irinotekan, které je přeměňováno mikrobiální  $\beta$ -glukuronidasou. V důsledku jeho reakce se zvyšuje toxicita léčiva, která může vést k průjmům, vzniku zánětu a anorexii [31,64]. Příkladem pozitivního působení střevní mikroflóry na metabolismus léčiva je například aktivace prontosilu nebo neoprontosilu. Jedná se o azo-antibakteriální prolečiva na bázi sulfanilamidu. Pro aktivaci léčiva se využívá redukčního metabolismu přítomných střevních bakterií z rodu *Clostridium* a *Eubacterium*, které aktivují léčivo prostřednictvím svých azoreduktas a nitroreduktas. Prontosil, neoprontosil a řada prolečiv (sulfasalazin, olsalazin, ipsalazid, balsalazid) kyseliny 5-aminosalicylové se používá při léčbě ulcerózní kolitidy a zánětlivých onemocnění střev [65].

Přirozená střevní mikroflóra dále přispívá k ochraně vnitřního prostředí před patogenními mikroorganismy. Tato ochrana je založena na velmi složitém mechanismu. Imunitní systém střevní sliznice musí udržovat homeostázu s prospěšnými druhy a zároveň musí bránit nadměrnému růstu rezistentních a patogenních druhů. K ochraně napomáhá mimo jiné i přítomnost vrstvy hlenu, která se skládá z mucinových glykoproteinů a chrání buňky epitelu [66]. Tento typ ochrany je typický hlavně pro tlusté střevo. V tenkém střevě je vrstva hlenu diskontinuální a nedostatečná, proto zde musí být jiný způsob ochrany. Bylo zjištěno, že přirozená střevní mikroflóra prostřednictvím vlastních metabolitů indukuje syntézu antimikrobiálních proteinů (např. katahelicidiny, lektiny typu C, defensiny). Tyto proteiny primárně narušují povrchové struktury komenzálů a patogenů [31,67,68]. Z pohledu produkce antimikrobiálních proteinů se předpokládá, že *Bacteroides thetaiotaomicron* patří mezi klíčové druhy řídící jejich produkci [67]. Studie navíc ukázaly, že *Bacteroides thetaiotaomicron* indukuje expresi matrixové metaloproteinasy (matrilysinu) z Panethových buněk tenkého střeva. Matrilysin dále štěpí prodefensin na aktivní defensin, který má antibakteriální aktivitu [69]. Dalším příkladem interakce mikroflóry s hostitelem při zajišťování antimikrobiální ochrany je schopnost rodu

*Lactobacillus* produkovat kyselinu mléčnou. Kyselina mléčná narušuje vnější membránu gramnegativních bakterií. Svým působením na vnější membránu zvyšuje antimikrobiální aktivitu lysozymu štěpícího peptidoglykany bakteriální buněčné stěny [70].

Střevní mikroflóra hraje významnou roli při udržování struktury a funkce GIT. Například *Bacteroides thetaiotaomicron* indukuje expresi malého proteinu 2A (SPRR2A) bohatého na prolin, který je nutný pro udržení desmosomů na epiteliálních klících [31]. Další mechanismus udržující těsné spoje je zprostředkován přes signalizaci TLR2 (protein „toll-like receptor 2“), který je stimulován peptidoglykany z mikrobiální buněčné stěny [71]. Další prospěšnou bakterií je *Lactobacillus rhamnosus* GG, který produkuje rozpustné proteiny (p40 a p75), které mohou předcházet apoptóze střevních epiteliálních buněk [72]. Na udržení správných funkcí střevní bariéry má podíl i endokanabinoidní systém. Například gram-negativní bakterie *Akkermansia muciniphilia* mohou zvyšovat hladiny endokanabinoidů, které regulují funkce střevní bariéry snížením metabolické endotoxemie (přítomnost lipopolysacharidů v krvi) [31].

### 1.2.3 Metody využívané pro studium střevní mikroflóry

V počátcích studování střevní mikroflóry bylo využíváno kultivace bakterií. Kultivace bývá často prováděna v různých typech média s obsahem živných látek i bez nich. Dále je možné provádět kultivaci za aerobních i anaerobních podmínek [73]. Metoda kultivace je stále využívána, ale pro studium celého střevního mikrobiomu je nedostačující. Střevní mikroflóra obsahuje celou řadu bakteriálních druhů, které nelze kultivovat. Kultivace je možná pouze u těch druhů bakterií, které byly vyloučeny z těla společně se zbytky nestrávené potravy. Z tohoto důvodu bylo potřeba nalézt výhodnější techniky, které by pomohly rozklíčovat složení střevního mikrobiomu z pohledu zastoupených bakteriálních druhů v celé šíři. Hlavní nevýhodou kultivace bakterií je dodržení striktních anaerobních podmínek během celého procesu. To v počátcích vedlo k izolaci pouze 10–25 % mikroflóry. S rozvojem anaerobních technik kultivace, při dodržení všech podmínek, je možné dosáhnout kultivace více než 50 % lidské fekální flóry [74,75].

Díky dostupnosti dnešních výkonných technologií sekvenování genů je možné studovat střevní mikrobiom velmi podrobně. Nejprve se izoluje bakteriální DNA, která kóduje gen pro 16S rRNA. Poté se provede sekvenace a bioinformatická analýza [31].

Při sekvenování bakteriálních genů se využívá metagenomická analýza. Oblast bakteriálního genu pro 16S rRNA má velikost 1,5 kb a je vysoce konzervativní. Obsahuje

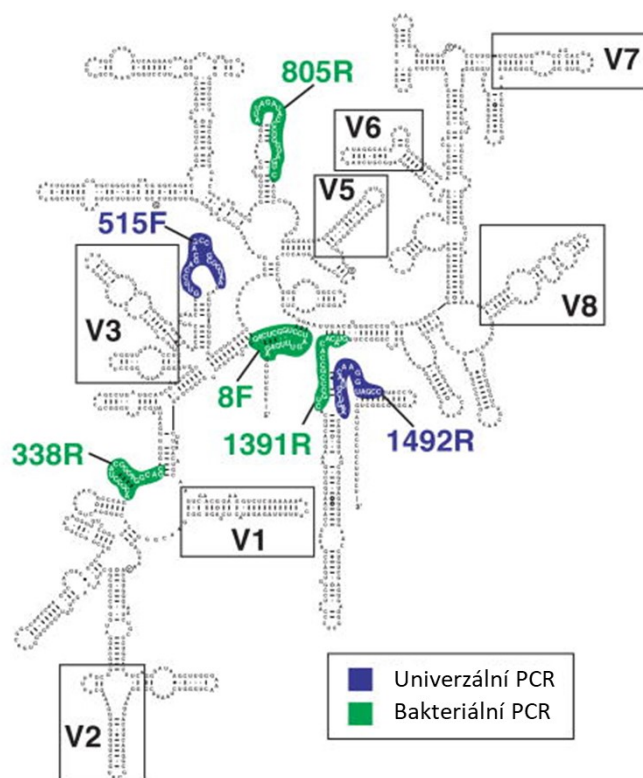
však i 9 hypervariabilních míst, která jsou vhodná pro rozlišení různých bakteriálních druhů [76]. Při bakteriální identifikaci se běžně sledují oblasti v 16S rRNA, které se označují jako V3, V4, V6 a V8. Na Obrázku 1 (str. 21) je zobrazena struktura bakteriálního genu kódujícího 16S rRNA s konzervativními a vyznačenými variabilními úseky. V počátcích studia se využívalo Sangerovo sekvenování, to bylo s rozvojem sekvenačních metod nahrazeno sekvenováním nové generace (NGS, z angl. „next generation sequencing“). Metody NGS poskytují obrovský objem dat ve srovnání se Sangerovým sekvenováním a urychlily celkový proces identifikace. Ovšem i tyto metody jsou při identifikaci náchylné k chybám. Nejčastější příčinou chyb je špatný výběr primerů nebo chyby plynoucí z metod přípravy knihovny [31]. V Tabulce 1 je uveden přehled využívaných sekvenačních technik společně s jejich přesností, výhodami a nevýhodami.

Tabulka 1: Přehled využívaných technik NGS

Název	Přesnost	Výhody	Nevýhody
454 (Roche) pyrosekvenování	99,9%	menší množství vzorku, dlouhá čtecí délka, velké množství vzorků se snadným čtením	drahé, homopolymerní chyby
"Shot gun" sekvenování	98,0%	krátké čtení v krátkém čase	náročnost na skládání úseků
Solexa (Illumina)	98,0%	přesné, rychlé, spolehlivé	drahé
Pacific Bio	99,9%	rychlé, dlouhá délka čtení	drahé vybavení
Ion Torrent	98,0%	rychlé, levnější vybavení	vícenásobné chyby monomeru
SOLiD	99,9%	méně nákladné ve srovnání s jinými metodami	pomalé a obtížné sekvenování palindromů

**Poznámka:** Tabulka byla sestavena na základě prací autorů Quail a kol. [77] a Liu a kol. [78]. Homopolymerní chyby = chyby ve čtení homopolymerních sekvencí (např. CCCCC).

Výsledkem sekvenování jsou velmi často objemná data, která jsou fragmentovaná a vzájemně se překrývají. Díky bioinformatické analýze jsou data „vyčištěna“, a pak je možné identifikovat bakteriální taxony. Provedení statistické analýzy sekvenačních dat pomáhá při identifikaci  $\alpha$ -diverzity (druhá bohatost vzorku),  $\beta$ -diverzity (změny v druhovém složení mezi vzorky) nebo relativního zastoupení druhu [31].



**Obrázek 1:** Model struktury DNA kódující gen pro 16S rRNA u bakterie *E. coli*. Ve struktuře jsou zobrazeny konzervativní a variabilní (V1–V8) oblasti. Na obrázku jsou také vyznačena místa, na která jsou cíleny jednotlivé PCR primery. Vhodný výběr primerů závisí na tom, jestli je cílem sekvenace celý gen nebo pouze subdoména, která obsahuje variabilní oblast. Obrázek byl převzat z práce autorů Peterson a kol. [76] a následně upraven.

### 1.3 Probiotika

Historie probiotik sahá už do minulých století, kdy lidé pro podporu svého zdraví pili například fermentované mléko. V roce 1899 objevil Henry Tessler, z Pausterova institutu v Paříži, bakterii rodu *Bifidobacterium* ve střevech kojenečích dětí. Záznamy uvádí, že tyto kojenci měli méně průjemových onemocnění. V roce 1917 byla izolována bakterie *Escherichia coli*, která byla použita pro cílenou léčbu pacientů se shigelosou [79]. První definice probiotik vznikla až v roce 1965 a byla omezena na látky produkované bakteriemi, které podporují růst dalších bakterií. V roce 1989 se objevila představa živého mikrobiálního doplňku, ovšem tato definice byla stále ještě spojována se zdravou výživou. Poslední, a zároveň současná definice, považuje probiotika za živé mikroorganismy, které je třeba

přijímat v dostatečném množství, aby měly pozitivní vliv na zdraví. Definice se neomezují pouze na nutriční účinky [80,81].

Na základě zmíněných definic i provedených studií je zřejmé, že probiotika ovlivňují zdravotní stav uživatele. Probiotika mají vliv na rezidentní mikrobiotu, buňky střevního epitelu i imunitního systému [80]. Probiotika jsou často využívána pro zlepšení rovnováhy mikroorganismů, které osidlují prostor střev a celého GIT. Působí proti potenciálním poruchám střevní mikrobiální rovnováhy, které jsou spojeny s užitím antibiotik. Zároveň snižují riziko kolonizace patogenními mikroorganismy [82]. Obecně lze probiotikum označit za „potravinu“ nebo přípravek obsahující nepatogenní, prospěšné živé bakterie a kvasinky [79].

Nejčastěji se v probioticích vyskytují rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Saccharomyces boulardii* [83]. Bakterie z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou fakultativně anaerobní, gram-pozitivní tyčinky. *Saccharomyces boulardii* jsou kvasinky [79]. První dostupná probiotika obsahovala pouze jeden druh mikroorganismů, a to především ty z rodu *Lactobacillus* nebo *Saccharomyces*. Následné formy probiotik už byly druhově rozmanitější a počet mikroorganismů se uvádí od  $10^8$  do více než  $10^{10}$  CFU (z angl. „colony forming unit“) [80]. Nejčastěji obsaženými druhy z rodu *Lactobacillus* jsou *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. sporogenes*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. lactus*, *L. brevis* a *L. cellobiosus* a z rodu *Bifidobacterium* to jsou *B. animalis*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *B. thermophilus* a *B. longum* [79,81]. Další bakterie obsažené v probiotických preparátech jsou *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. alivarius*, *S. intermedius*, rod *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* a *Enterococcus* [81].

V posledním desetiletí ve společnosti extrémně vzrostl zájem o užívání probiotik. V roce 2014 v USA přesahovaly tržby z prodeje probiotik 1,1 miliardy dolarů, celosvětově to pak bylo 25 miliard dolarů. Probiotika jsou navíc považována za zdravou výživu, proto nejsou regulována Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a jsou ve většině případů volně dostupná. Většina uživatelů je přesvědčena, že všechna probiotika fungují a vyživují je při nejrůznějších zdravotních komplikacích. Menší část spotřebitelů si uvědomuje, že ne všechny značky probiotik jsou stejně účinné, a ne všechny působí stejně na daný zdravotní problém [79]. Studie ukazují, že probiotická účinnost může být druhově i dávkově specifická, a že délka užívání závisí na klinické indikaci. Zároveň platí, že účinnost probiotik

je specifická i ve vztahu k různým chorobám a zdravotním problémům. Studie ukázaly účinnost probiotik při akutním infekčním průjmu, průjmech souvisejících s užíváním antibiotik, průjmech způsobených bakterií *Clostridium difficile*, při jaterní encefalopatii, ulcerózní kolitidě, syndromu dráždivého tračnicku, funkčních gastrointestinálních poruchách a nekrotizující enterokolitidě. Naopak existují důkazy, že léčba probiotiky není účinná při akutní pankreatitidě a Crohnově chorobě [83]. V tomto případě nelze říct, že by probiotika nemocnému uživateli škodila. Ovšem při jejich užívání nebyl nalezen předpokládaný efekt, který by přinášel nemocnému uživateli výhody [84].

### 1.3.1 Vybrané mechanismy účinku probiotik

Střevní mikroflóra může být pozměněna působením stravy, životním stylem, expozicí toxinům nebo užíváním antibiotik. Studie prokázaly vztah mezi zdravím, nemocí, imunitním systémem a změnami v mikroflóře. Pro udržení zdraví je důležitá rozmanitost prospěšných mikroorganismů, proto jsou širokospektrá probiotika terapeuticky účinnější [83].

Obecně lze mechanismy působení probiotických mikroorganismů vysvětlit zvýšením specifické a nespecifické imunitní odpovědi hostitelem, produkcí antimikrobiálních látek, kompeticí s patogeny o živiny a vazebná místa na sliznici střev. Některá probiotika vykazují adhezi a kolonizaci (alespoň přechodnou), což prodlužuje jejich retenční čas v lidském těle a prodlužuje probiotickou aktivitu [81]. Mechanismy působení probiotik jsou velmi složité. Ve studii autorů Wilkins a kol. [83] jsou rozděleny do sedmi skupin.

Do první skupiny probiotik jsou řazeny mikroorganismy, které blokují adhezi patogenních bakterií na střevní epitel a produkují inhibiční látky. Probiotika druhé skupiny posilují střevní imunitní odpovědi [85]. Pro třetí skupinu je typický mechanismus, který udržuje normální hladiny SCFA [86]. Čtvrtá skupina probiotických bakterií má schopnost modulovat funkce imunitního systému (např. potlačují střevní prozánětlivé cytokiny). Do páté skupiny patří probiotické bakterie „opravující“ střevní propustnost [83]. Šestá skupina probiotik (např. *Saccharomyces boulardii*) je schopná se přímo vázat na gram-negativní patogenní bakterie, a tím potlačovat jejich růst [87]. Poslední skupinu tvoří mikroorganismy, které regulují absorpci elektrolytů a dalších látek ve střevě [85]. Kromě zmíněných mechanismů mají probiotika schopnost dekonjugovat žlučové kyseliny, a tím snižovat hladinu cholesterolu. Dále mohou vazbou toxinů a karcinogenů zabraňovat jejich absorpci střevem [88].

### 1.3.2 Komerční probiotické přípravky

Každá země na světě má svůj úřad pro kontrolu potravin a léčiv. V USA funguje organizace označovaná jako FDA [89], v České republice je Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL). Každému institutu tohoto typu přísluší povinnost kontrolovat a schvalovat prodávaná léčiva v příslušném státě. Přípravky označované jako doplňky stravy (DS) jsou těmito úřady regulovány poněkud odlišným způsobem než léky. Všichni výrobci léků usilující o uvedení svého léčiva na trh musí dokládat účinnost a bezpečnost svého přípravku klinickými studiemi. Na rozdíl od léků jsou ale DS volně prodejné přípravky, které nepodléhají prakticky žádné kontrole. Pro uvedení DS na trh neexistuje žádný požadavek na prokázání účinnosti. Výrobci DS pouze nesmí tvrdit, že jejich doplněk lze použít k léčbě nebo prevenci jakéhokoli konkrétního onemocnění. Na výrobku mohou být uvedena prohlášení o „obecném blahu, funkcích i zdraví“. To ovšem pouze za předpokladu, že se výrobce zřekne odpovědnosti [89]. Důvodem je jejich individuální účinek na každého uživatele a na konkrétní zdravotní problém [79].

Jako komerční probiotické preparáty jsou označovány běžné potravinové doplňky obsahující nakultivované probiotické bakteriální kmeny [90]. Komerční probiotické preparáty jsou nejčastěji dostupné v podobě kapslí [82], ale existují i kapalné přípravky (KPP využitá pro tuto studii). Pro probiotika se velmi často využívají bakteriální druhy produkující proteiny nazývané bakteriociny. Produkce bakteriocinů je často popisována jako žádoucí probiotická vlastnost. Ve specifických případech bylo popsáno, že tato látka podporuje probiotické přežití v GIT (genová exprese bakteriocinu zvyšuje kolonizační potenciál například druhu *Lactobacillus salivarius*, a zároveň inhibuje konkurenční mikroorganismy [91]), přispívá ke kontrole patogenů a částečně ovlivňuje hostitelovu genovou expresi (genů podílejících se na zánětu [92]) ve střevních buňkách [93]. Studie autorů Hegarty a kol. [93] se zaměřila na stanovení bakteriocinu produkovaného bakteriemi přítomnými v blíže nespecifikovaných KPP. Součástí studie dále byla identifikace bakterií zodpovědných za produkci bakteriocinů a zjištění jejich podílu v KPP. Z 16 testovaných produktů byla produkce bakteriocinu prokázána pouze u 8 izolátů. Bylo zjištěno, že ve všech těchto izolátech produkujících bakteriocin byl přítomen *Lactobacillus acidophilus* a identifikovaným bakteriocinem byl laktacin B.



### 1.3.2.1 Probiotika firmy Ascended Health

Předkládaná práce se zabývá probiotiky firmy Ascended Health, proto bude následující oddíl věnován těmto přípravkům. Veškeré informace jsou čerpány z webových stránek firmy Ascended Health [94]. Nemusí se proto jednat o vědecky podložené a ověřené informace.

Všichni dobrovolníci účastníci se této studie užívali současně 2 druhy KPP od americké firmy Ascended Health. Firma vyrábí „léčivé“ přípravky přírodního původu. Pro výrobu přípravků jsou používány rostlinné látky, minerály a byliny.

Přípravek „Pro Alive“ je tekutý probiotický preparát přírodního původu. Firma uvádí, že přípravek obsahuje vyšší koncentraci prospěšné mikroflóry a další látky jako jsou vitaminy B, blíže nedefinované enzymy, organismy produkující bakteriociny proti patogenním bakteriím, inhibitory kvasinek a plísní a další nedefinované látky potřebné pro homeostázu. Přípravek „Pro Alive“ je „multifunkční“ probiotikum určené pro doplnění prospěšné mikroflóry například po léčbě antibiotiky, pro zvýšení imunitní odpovědi na virové, bakteriální a plísňové infekce a na podporu adaptace na stres. Přípravek obsahuje 20 druhů „prospěšných“ bakterií (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. amylovorus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* ME-3, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. buchneri*, *L. acetotolerans*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *P. bifidum*, *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus subtilis* subsp. *natto*, *Saccharomyces boulardii*). Výrobce upozorňuje, že vedlejším účinkem přípravku mohou být příznaky podobné chřipce.

Druhý užívaný KPP se nazývá „Active Detox“, který obsahuje živé mikroby, chelátory a více než 60 stopových minerálů. Přípravek pomáhá „detoxikovat“ játra a ledviny uživatele. Tento preparát je navržen tak, aby pomáhal tělu při odstraňování parazitů a toxinů. K procesu „detoxikace“ by měly pomáhat přítomné chelátory a humáty, které vychytávají toxiny. Tyto komplexy jsou poté vyhledány dodanými mikroby a jsou za jejich účasti rozkládány na neškodné molekuly. Vedle podpory detoxikace jater a ledvin by měl výrobek pomáhat při zotavení z chronické únavy, pozvednutí nálady při depresích a k optimalizaci hmotnosti. Přípravek obsahuje 9 druhů „prospěšných“ mikrobů (*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum* 299v, *L. acidophilus* DDS-I, *L. fermentum* ME-3, *L. curvatus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. lactis*, *Saccharomyces boulardii*). Vedlejším účinkem přípravku mohou být opět příznaky podobné chřipce.

### 1.3.2.2 Probiotika dostupná na českém trhu

Český trh nabízí celou řadu probiotických výrobků, které jsou stále obměňovány. Jistý seznam těchto probiotických výrobků je dostupný na webových stránkách Společnosti pro probiotika a prebiotika o.s. [44]. Tato společnost na svých stránkách rozděluje probiotické výrobky do 5 skupin (fermentované výrobky, doplňky stravy – KPP, potraviny pro kojence a malé děti, potraviny pro zvláštní lékařské účely a ostatní výrobky). Mezi fermentovanými výrobky najdeme například mléčný nápoj Actimel (obsahuje jogurtové a probiotické kultury) nebo jogurt Activia (obsahuje živou kulturu *Bifidobacterium*). Z doplňků stravy, které pomáhají obnovit střevní mikroflóru, lze jmenovat například přípravky Probiotics 20, Candistop, Bio-Kult. Za zmínku stojí i potraviny pro zvláštní lékařské účely. Tato skupina výrobků musí být používána pod dohledem lékaře. Jsou zde uvedeny přípravky jako například ColonFit Plus (obsahuje živé bakterie a vlákninu) nebo ENTEROL, který je veden jako lék a spadá pod kontrolu SÚKL.

V České republice jsou dostupné pouze nekapalné probiotické přípravky. Všechny výše zmíněné DS jsou prodávány ve formě kapslí rostlinného původu. Probiotika, stejně jako v této práci užívané KPP, obsahují živé kultury probiotických bakterií. Probiotika z českého trhu obsahují, podobně jako KPP užívaná při této studii, rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Přípravky nelze srovnávat podle množství mikroorganismů na jednu dávku. Například přípravek Probiotics 20 obsahuje 20 mld CFU na denní dávku (10 mld CFU/kapsle), firma Ascended Health tento údaj u svých přípravků neudává. Na rozdíl od užívaných KPP se probiotika dostupná na českém trhu nemusí skladovat v chladu [44].

Vzhledem k množství dostupných probiotických přípravků a výrobků na českém i celosvětovém trhu je v této práci zmíněna pouze nepatrná část. Výrobky podporující střevní mikroflóru dosahují velké popularity, a proto by zde mohl být uveden mnohem rozsáhlejší seznam.

### 1.3.3 Ostatní probiotika

Vedle KPP existují i jiná probiotika. Za probiotika se dají považovat různé kysané potraviny (např. jogurty, kefíry, sýry a další fermentované potraviny) [95,96]. Už v minulosti využívali lidé fermentaci mléka pro jeho dlouhodobé uchování. Tyto procesy zahrnovaly neřízené a pomalé zakysání mléka, které bylo způsobeno v něm přítomnými mikroorganismy. Současné technologie využívají vybrané mléčné mikroorganismy, které provádějí

specifickou fermentaci mléka za přesně stanovených podmínek (pH, teplota, obsah vody). Hlavním účelem přípravy fermentovaných produktů je dosažení lepších fyzikálních, chemických a nutričních vlastností [96]. Pro fermentaci jsou běžně využívány bakterie mléčného kvašení, *Bifidobacterium* a kvasinky. Skupina bakterií mléčného kvašení zahrnuje několik členů z rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* a *Pediococcus* [97]. Cílená mléčná fermentace zlepšuje kromě nutričních vlastností produktů stravitelnost složek mléka, a také vede k syntéze některých vitaminů B během procesu. V průběhu fermentačního procesu produkují navíc mléčné kultury řadu metabolitů (např. antibakteriální, antikarcinogenní, anticholesterolemické sloučeniny) a enzymů. Fermentované produkty mohou být považovány za probiotika, protože vedle lepších nutričních vlastností mohou mít i částečnou terapeutickou účinnost [96].

## 1.4 Prebiotika a vláknina

Vláknina bývá často nazývána prebiotikum. Ačkoliv všechna prebiotika jsou vláknina, ne všechna vláknina je prebiotikum. Rozdíl mezi prebiotiky a vlákninou spočívá v tom, že prebiotika jsou fermentována přesně definovanými skupinami mikroorganismů a vlákninu z potravy využívá většina mikroorganismů tlustého střeva [98]. Prebiotika lze tedy definovat jako „selektivně fermentované složky potravy, které podporují růst bakterií, umožňují specifické změny ve složení a aktivitě střevní mikroflóry“. Svým působením přináší konzumentovi výhody a zlepšují jeho zdravotní stav [99,100]. Je známo, že různá prebiotika stimulují růst různých původních střevních bakterií [101]. Hlavním cílem prebiotik jsou zejména rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [99].

Jestliže má být příslušná složka potravin klasifikována jako prebiotikum, musí odolávat působení žaludečních kyselin, hydrolýze savčích enzymů a absorpci v horní části GIT. Dále musí být fermentována potenciálně prospěšnou střevní mikroflórou. Podle definice musí také selektivně stimulovat růst a aktivitu střevních bakterií potenciálně spojených s pozitivním vlivem na zdravotní stav hostitele [99,102].

Všechna známá prebiotika jsou tvořena především karbohydrátovými sloučeninami, primárně oligosacharidy, které jsou fermentovány mikroflórou až v prostředí tlustého střeva. Provedené studie prokázaly, že všechny aspekty definice prebiotik splňují sloučeniny jako například inulin, oligofruktosa, laktulosa nebo rezistentní škrob. Ukázalo se, že všechny tyto látky stimulují bakterie rodu *Bifidobacterium*. Prebiotické účinky mají i další izolované sacharidy nebo potraviny obsahující sacharidy, například galaktooligosacharidy,

transgalaktooligosacharidy, polydextrosy, psyliu, pšeničný dextrin, arabská guma, celozrnná pšenice a celozrnná kukuřice [99]. Prebiotika jsou dále běžně obsažena v potravinách jako je pórek, rajče, chřest, čekanka, topinambura, česnek, cibule, banán, oves, ječmen, luštěniny a sója [102,103].

Prebiotika bývají používána jako alternativa k probiotikům, nebo jako jejich další podpora. Výhodou prebiotických látek je jejich dlouhodobá stabilita, korelující s použitelností potravin, dále je to jejich odolnost vůči zpracování a samozřejmě jejich fyzikální a chemické vlastnosti, které mají pozitivní vliv na chuť a konzistenci produktů. Další pozitivní vlastností prebiotik je jejich rezistence vůči žaludečním a žlučovým kyselinám a proteasám přítomným v GIT. Prebiotické látky selektivně stimulují mikroorganismy přítomné ve střevním mikrobiomu hostitele, a tím pomáhají eliminovat konkurenční bakteriální druhy. Stimulace střevních bakterií prebiotiky určuje jejich fermentační aktivitu a současně ovlivňuje hladinu SCFA, což má pro hostitele pozitivní přínos. Prebiotika navíc snižují pH v prostředí střev a podílí se na osmotické regulaci ve střevě. Nadměrné užívání prebiotik může mít i negativní vliv, například může vést k nadýmání a průjmům [102].

Prebiotické látky jsou přítomné v mnoha produktech přírodního původu. Zároveň bývají často přidávány do potravin za účelem zvýšení nutriční a zdravotní hodnoty těchto produktů. Nejčastěji se přidává inulin a fruktooligosacharidy. Tyto látky mohou sloužit jako médium pro probiotika. Prebiotika stimulují růst pouze potenciálně prospěšných mikroorganismů, samy o sobě neobsahují žádné mikroorganismy [102].

## 2 Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda užití komerčních probiotických preparátů u 9 dobrovolníků ovlivňuje biodiverzitu střevních bakterií.

Pro řešení tohoto cíle je potřeba splnit následující úkoly:

- izolovat bakteriální DNA z odebraných fekálních vzorků
- pomocí metody PCR-DGGE pozorovat vliv KPP na složení bakteriální mikrobioty pacientů
- za pomoci Sangerova sekvenování identifikovat vybrané bakteriální druhy
- metodou NGS identifikovat významné bakteriální druhy a porovnat složení mikrobiomu jednotlivých dárců
- určit nejhojněji zastoupené bakteriální druhy ve střevním mikrobiomu dárců
- ověřit zvýšené množství protektivních druhů bakterií přítomných v užívaných KPP

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

##### Beckman Coulter (USA)

- AMPure XP for PCR Purification

##### BioConcept (Švýcarsko)

- 10% TAE pufr

##### Elisabeth® Pharmacon (Velká Británie)

- EliZyme HS Robust MIX Red

##### Invitrogen (USA)

- 1M Tris

##### KAPA BIOSYSTEMS Roche (USA)

- qPCR Master Mix
- Primer

##### New England BioLabs (USA)

- „Barcodes“
- Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg)
- NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent™
- One *Taq*® Quick-Load® 2× Master Mix with Standard Buffer
- Quick-Load® 200bp DNA Ladder

##### QIAGEN (Německo)

- QIAamp® PowerFecal® DNA Kit (50)

##### Serva (Německo)

- Agarosa
- Močovina

- Persulfát amonný

#### **Sigma-Aldrich (USA)**

- Akrylamid
- Formamid
- Deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- SYBR Green

#### **ThermoFisher Scientific (USA)**

- 10% TBE pufr
- Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit
- Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit

#### **Top-Bio (Česká republika)**

- PCR ethidiumbromid

#### **VWR Chemicals (USA)**

- *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin

#### **Experimentální vzorky**

Pro práci bylo získáno celkem 70 lidských fekálními vzorků. Vzorky poskytlo 9 různých dobrovolníků z Brna a okolí do 20 km. Vzorky byly odebírány za aerobních podmínek v předem stanovených intervalech. Navržené a doporučené schéma pro užívání KPP a odběr vzorků je na Obrázku 2 (str. 32). Všichni dárce užívali stejné KPP („Pro Alive“ – ráno, „Active Detox“ – večer) od firmy Ascended Health. Oba přípravky byly skladovány v lednici, ve shodě s doporučením výrobce.

	Den	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	Odběr vzorku	x					x							x														
Počet kapek	ProAlive	0	2	2	2	2	2	0	0	3	3	3	3	3	0	0	4	4	4	4	4	4	0	0	5	5	5	5
	Active Detox	0	2	2	2	2	2	0	0	3	3	3	3	3	0	0	4	4	4	4	4	4	0	0	5	5	5	5
		27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
		5	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	
		5	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	
		53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
		6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		6-8	6-8	6-8	0	0	6-8	6-8	6-8	6-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

**Obrázek 2:** Rozvržení užívání KPP a odběr fekálních vzorků. Na obrázku jsou znázorněny pokyny pro uživatele KPP. Dávka KPP a den odběru vzorku byly navrženy na základě zkušeností Ing. Jakuba Mrázka, Ph.D.. První vzorek byl odebrán den před užitím KPP, druhý 5 dní od začátku užívání KPP, třetí vzorek 12 dní od začátku užívání KPP, čtvrtý vzorek 2 týdny po 3. vzorku, pátý vzorek 2 týdny po 4. vzorku, šestý vzorek byl odebrán v poslední den užívání KPP, sedmý vzorek 4. den po ukončení užívání KPP, osmý vzorek 2 týdny po ukončení užívání KPP. Zelená oblast označuje dobu užívání KPP.

### 3.1.2 Účastníci studie

- **Dárce D** – muž, 39 let, 178 cm, 107 kg, nekuřák

- Alkohol: 0
- Zdravotní stav: bez komplikací
- Léky: 0
- Dieta: běžná strava
- Sport: 4krát týdně

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „Nepocíťoval jsem žádné změny.“

- **Dárce DA** – žena, 40 let, 174 cm, 85 kg, 1 rok nekuřák (předtím 20 let kuřák)
- Alkohol: 0
- Zdravotní stav: borelióza, EBV, HSV, endometriososa, oslabená imunita, omezený pohyb – spinální problémy, mentální problémy
- Léky: Amloratio, Tamalis, Cordyceps, bylinné kapky, vitamin C, vitamin A, Omega3, hořčík, blíže nespecifikovaná homeopatika
- Dieta: nízkosacharidová a bezlepková dieta (ne striktní)
- Sport: občas

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „Na začátku užívání jsem pocíťovala mírně "přelívání" v břiše/střevech, než si tělo zvyklo, během užívání o dost lepší, důkladnější a pravidelnější vyprazdňování.“

- **Dárce DK** – žena, 32 let, 168 cm, 76 kg, nekuřák, jednovaječné dvojče s dárce JJ
- Alkohol: 0



- Zdravotní stav: těhotná
- Léky: 0
- Dieta: běžná strava
- Sport: 0

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „Během užívání probiotik jsem v těhotenství netrpěla zácpou, stolice byla pravidelná.“

- **Dárce EJ** – žena, 39 let, 156 cm, 68 kg, nekuřák
  - Alkohol: příležitostně
  - Zdravotní stav: celiakie, laktosová intolerance, časté migrény, nadváha
  - Léky: 0
  - Dieta: bezlepková a bezlaktosová dieta
  - Sport: 2krát týdně

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „Při navyšování dávky (přibližně první měsíc až 6 týdnů) pocít nachlazení, únava, zahlenění a pocít, že člověk „není ve své vlastní kůži a něco na něj leze“. Výraznější reakce břicha, různé pohyby střev (nepříjemné, ale ne bolestivé), výraznější nadýmání než před užíváním probiotik, stolice nepravidelná a někdy řídká (ale ne průjem), výraznější zápach. Při užívání plné dávky probiotik jsem se celkově cítila dobře a bez problémů. Reakce břicha byly pouze výjimečné a většinou jsem byla schopna identifikovat jaké jídlo je mohlo vyvolat. Stolice byla pravidelná a pevná, zápach výraznější pouze občas. Během užívání probiotik jsem si udělala neplánovanou pauzu (dovolená v Gruzii, kdy jsem si zapomněla vzít probiotika s sebou). Při pauze jsem pocítovala denně výraznější reakce břicha, měla jsem průjem, ale ten mohl být vyvolán i změnou stravy. Po opětovném nasazení probiotik jsem se cítila dobře, bez problémů (žádný pocít nachlazení jako poprvé), měla jsem pocít, že břicho se opět stabilizovalo a reakce břicha byly pouze výjimečné a opět jsem byla schopna identifikovat jaké jídlo je mohlo vyvolat. Stolice byla pravidelná a pevná, zápach se změnil a snížil. Po vysazení probiotik jsem pocítovala občasné reakce břicha, stolice byla většinou pravidelná a pevná, občas měla výraznější zápach.“

- **Dárce JJ** – žena, 32 let, 165 cm, 57 kg, nekuřák, jednovaječné dvojče s dárce DK
  - Alkohol: 0
  - Zdravotní stav: bez komplikací
  - Léky: 0
  - Dieta: paleo dieta

- Sport: 4krát týdně

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „První cca měsíc se u mě projevila mírná detoxikace organismu, kdy vždy začátkem týdne (po dvoudenní víkendové pauze) jsem v pondělí pocítovala přes den škrabání v krku (náběh na nachlazení), ale pak to do večera zmizelo. Pravidelně v úterý mě i odpoledne pobolívala hlava, před užíváním nikdy. V průběhu užívání se mi upravila stolice z občasných zácp na pravidelné vylučování.“

- **Dárce K** – žena, 44 let, 169 cm, 61 kg, nekuřák

- Alkohol: příležitostně
- Zdravotní stav: bez komplikací
- Léky: Xados, Trittico
- Dieta: běžná strava
- Sport: 2krát týdně

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „Zmizelo u mě nadýmání, došlo k úpravě stolice, byla jsem absolutně bez průjmů a bolesti břicha.“

- **Dárce MR** – žena, 29 let, 151 cm, 56 kg, nekuřák (občas vodní dýmka)

- Alkohol: příležitostně
- Zdravotní stav: problémy se žlučníkem a štítnou žlázou
- Léky: Helicid, Euthyrox
- Dieta: „alternate day fasting“ dieta
- Sport: 3krát týdně

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „Ze začátku užívání probiotik jsem měla bolest hlavy a jakoby náběh na nachlazení, a pak nic.“

- **Dárce R** – žena, 65 let, 158 cm, 79 kg, nekuřák

- Alkohol: příležitostně
- Zdravotní stav: glutenová intolerance, chronická obstrukční plicní nemoc, vysoký krevní tlak, zvýšené hladiny cukru a cholesterolu
- Léky: Spiriva, Telmisartan, Indapamid, Betalok, Godasal
- Dieta: paleo dieta
- Sport 2krát týdně

**Fyziologické – subjektivní pocity:** „Do pěti kapek jsem nepocítovala žádné fyziologické změny, u více kapek řidší stolice, opakované vyprazdňování 4–5krát po sobě.“

- **Dárce S** – žena, 68 let, 165 cm, 67 kg, nekuřák
    - Alkohol: příležitostně
    - Zdravotní stav: alergie, astma, onkologický pacient – karcinom tlustého střeva v roce 2013
    - Léky: Trittico 150, Cezera, Stilnox, Airflusan 500, Pyridoxin
    - Dieta: Cambridge dieta (prvních 6 týdnů užívání KPP), běžná strava
    - Sport: cvičení, chůze
- Fyziologické – subjektivní pocity:** „Nepocítovala jsem žádné zvláštní změny.“

### 3.1.3 Přístroje

#### Centrifugy

- HERMLE Z216 MK, HERMLE LaborTechnik (Německo)
- MSE Sanyo HAWK 15/05 Refrigerated Centrifuge, Sanyo Gallenkamp PLC (U.K.)

#### Homogenizátor

- FastPrep<sup>®</sup>-24, M. P. Biomedicals (USA)

#### Magnetická míchačka

- ESP stirrer, VELP Scientifica (Itálie)

#### Minicentrifuga

- MiniSpin Plus, Eppendorf AG (Německo)
- PlateFuge microplate microcentrifuge, Benchmark Scientific (USA)

#### NanoDrop

- Thermo Scientific<sup>™</sup> NanoDrop<sup>™</sup> One, ThermoFischer Scientific (USA)

#### PCR Termocyclery

- Biometra Tadvanced 96 SG, Biometra GmbH (Německo)
- Biometra Thermocycler T-Gradient, Biometra GmbH (Německo)

#### Peristaltické čerpadlo s dávkovačem

- PCD 21, Kouřil (Česká republika)

## **Předvážky**

- KERN EW600-2M, Kern & Sohn GmbH (Německo)

## **qPCR cycler**

- Quant Studio™ 3 Real-Time PCR Instrument (96-Well 0,2ml Block), ThermoFisher Scientific (Singapur)

## **Sekvenační čip**

- Ion 316™ Chip Kit v2 BC, ThermoFischer Scientific (USA)

## **Sekvenační zařízení**

- Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), ThermoFischer Scientific (USA)

## **Sekvenátor pro přípravu templátu**

- Ion One Touch™ 2 Systém, ThermoFischer Scientific (USA)

## **Transluminátor**

- Model UVT 400-M, International Biotechnologies Inc. (USA)

## **Třepačka**

- VSR 23, Grant BOEKEL (Anglie)

## **Vodní lázeň**

- Julabo TW12, Julabo Labortechnik GmbH (Německo)

## **Vortex**

- VWR Pulsing Vortex Mixer, Avantor Inc. (USA)

## **Zařízení pro přípravu 18MΩ vody**

- Direct-Q® 3UV Water Purification, Sigma-Aldrich (Německo)

## **Zdroje pro elektroforézy**

- PowerPRO 300, Cleaver Scientific (U.K.)

- PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

### Zobrazovací zařízení

- Molecular Imager® GelDoc™ XR+, Bio-Rad (USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Izolace bakteriální DNA z lidských fekálních vzorků

Bakteriální DNA z lidských fekálních vzorků byla izolována za použití komerční soupravy „QIAamp® PowerFecal® DNA Kit“ (QIAGEN). Pro izolaci bylo odváženo cca 0,25 g fekálních vzorků. Odebrané vzorky byly resuspendovány v 750 µl roztoku „PowerBead Solution“. Celý objem vzorků byl převeden do mikrozkuvek typu „Dry Bead Tube“. Následně bylo přidáno 60 µl roztoku „Solution C1“ a mikrozkuvky byly krátce promíchány na Vortexu. Poté byly vzorky inkubovány po dobu 5 minut ve vodní lázni (Julabo TW12) temperované na 70 °C. Po inkubaci byly vzorky homogenizovány 1 minutu při třepací rychlosti 6,5 m/s v homogenizátoru (FastPrep®-24). Proces inkubace a homogenizace byl opakován dvakrát. Po druhé homogenizaci byly mikrozkuvky centrifugovány 1 minutu při 13 000× g na centrifuze (Labnet Prism R). Z mikrozkuvek bylo převedeno 500 µl supernatantu do 2ml mikrozkuvky typu „Collection Tube“. K supernatantu bylo přidáno 250 µl roztoku „Solution C2“ a krátce promícháno na Vortexu. Poté byly vzorky inkubovány 5 minut v boxu chlazeném ledem. Po inkubaci byly opět mikrozkuvky centrifugovány 1 minutu při 13 000× g. Z mikrozkuvek bylo opatrně převedeno cca 600 µl supernatantu do nových mikrozkuvek typu „Collection Tube“. K supernatantu bylo přidáno 200 µl roztoku „Solution C3“, krátce promícháno na Vortexu a inkubováno 5 minut v boxu chlazeném ledem. Po inkubaci byla provedena centrifugace (1 minuta, 13 000× g) a cca 600 µl supernatantu bylo převedeno do nové mikrozkuvky typu „Collection Tube“. K supernatantu bylo přidáno 1200 µl promíchaného roztoku „Solution C4“ a celý objem mikrozkuvky byl krátce promíchán na Vortexu. V dalším kroku byl veškerý supernatant odstraněn za použití filtrace přes kolonku „MB Spin Column“. Vzorky byly filtrovány po částech (max. 650 µl) centrifugační rychlostí 13 000× g po dobu 1 minuty. Na kolonku bylo dávkováno 500 µl roztoku „Solution C5“ a opět centrifugováno 1 minutu při 13 000× g. Supernatant byl odstraněn a byla provedena centrifugace „na prázdno“ (2 minuty, 13 000× g). Po této centrifugaci byly ponechány

kolonky na vzduchu vyschnout 2 minuty a pak byly kolonky umístěny na nové „Collection Tube“. Na střed membrány kolonky bylo pipetováno po 100 µl roztoku „Solution C6“. Centrifugací (1 minuta, 13 000× g) byla uvolněna bakteriální DNA zachycená na kolonce do nové mikrozkuřavky. Pro kontrolu úspěšné izolace byla změřena koncentrace DNA na přístroji NanoDrop One<sup>C</sup>. Bylo využito programu pro měření koncentrace dsDNA (z angl. „double-stranded DNA“) v rozmezí vlnových délek 230 a 280 nm. Pro další použití byly mikrozkuřavky s izolovanou DNA zamrazeny na –20 °C.

### **3.2.2 PCR-DGGE analýza fekálních bakterií**

Pro analýzu přítomných fekálních bakterií byla použita kombinace metody PCR a DGGE (z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“). Při práci bylo využito metodiky dle autorů Muyzer a kol. [104].

Pro analýzu přítomných bakteriálních druhů byla použita metoda PCR, pomocí které byl amplifikován úsek DNA, který kóduje gen pro 16S rRNA. Tento gen je společnou částí genomu všech druhů bakterií. Současně tento úsek DNA obsahuje variabilní části, které odlišují jednotlivé bakteriální druhy.

Metoda gradientové elektroforézy v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (DGGE) je vhodná pro separaci krátkých a středně dlouhých fragmentů DNA. Tato metoda bývá často využívána pro identifikaci jednonukleotidových polymorfismů bez nutnosti sekvenování DNA nebo pro molekulární identifikaci rozsáhlých ekosystémů. Identifikace ekosystémů je spojena právě s amplifikací genu pro 16S rRNA [105]. Princip metody je založen na elektroforetické pohyblivosti amplifikovaných fragmentů dsDNA prostředím s rostoucí denaturující silou. Fragmenty se pohybují na základě jejich molekulové hmotnosti (rozdíl ve složení nukleotidových bází). S rostoucí denaturující silou gelu dsDNA denaturuje a vzniká ssDNA (z angl. „single-stranded DNA“), jejíž pohyblivost je výrazně nižší. Rozpad dsDNA je závislý především na množství vodíkových můstků v každém z fragmentů. Pro zkvalitnění detekce (ostrot zón) a stejné počáteční vlastnosti pro všechny fragmenty dsDNA se využívá komerčně připravovaných primerů. Tyto primery obsahují tzv. GC svorky bohaté na guanin a cystein a jejich délka se pohybuje mezi 30 a 60 bp [106].

#### **3.2.2.1 PCR amplifikace genu pro 16S rRNA**

Pro PCR reakci byly postupně rozmrazeny jednotlivé sady vzorků izolované bakteriální DNA viz. kapitola 3.2.1 (str. 37). Do 200µl mikrozkuřavek byla připravena PCR směs

pro provedení polymerasové reakce. Složení PCR směsi a objemy složek pro reakci jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Složení a objem PCR směsi pro přípravu jednoho vzorku

Složka PCR směsi	V [μl]
Templát DNA	1
Primer 338GC	1
Primer 534RP	1
dH <sub>2</sub> O	12
PCR mix	15

**Poznámka:** PCR mix (One Taq<sup>®</sup> Quick-Load<sup>®</sup> 2× Master Mix with Standard Buffer, New England BioLabs) PCR mix obsahuje: 20mM Tris-HCl (pH 8.9 při 25 °C), 22mM KCl, 22mM NH<sub>4</sub>Cl, 1.8mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP, 0.2mM dTTP, 5% Glycerol, 0.06% IGEPAL<sup>®</sup> CA-630, 0.05% Tween<sup>®</sup> 20, 1× Xylen cyanol, 1× Tartrazin, 25 U/ml OneTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, 10μM „Forward“ primer 338GC (5'-CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCGCCACTCCTACGGGA-GGCAGCAG-3') 10μM „Reverse“ primer 534RP (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'); PCR dH<sub>2</sub>O (Top-Bio).

Amplifikace byla provedena v „PCR cycleru“ (Biometra TAdvanced 96 SG).

Nastavení PCR programu je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled kroků PCR pro amplifikaci úseku DNA kódujícího gen pro 16S rRNA

Krok	T (°C)	t (s)	Cykly
1	95	300	-
2	95	30	34×
3	58	20	
4	72	40	
5	72	300	-
6	10	∞	-

**Poznámka:** Při teplotě 95 °C dochází k teplotní denaturaci dvoušroubovice DNA, snížení teploty na 58 °C umožnění nasednutí primerů na rozvolněné řetězce DNA, následné zvýšení teploty na 72 °C vede k elongaci nových řetězců DNA. Kroky 2, 3 a 4 byly 34× opakovány pro dosažení vysoké míry amplifikace DNA. V 6. kroku bylo nutno přístroj vypnout.

### 3.2.2.2 Kontrola amplifikace DNA

Pro kontrolu úspěšné amplifikace požadovaného úseku DNA bylo využito agarosové elektroforézy. Z TBE pufru (složení roztoku: 89mM Tris, 89mM kyselina boritá a 2mM EDTA) byl připraven 1,5% agarosový gel. Roztok agarosy byl přiveden k varu a bylo přidáno 5 μl ethidiumbromidu (koncentrace 10 mg/ml). Po zchlazení na teplotu cca 55 °C bylo nalito na elektroforetickou misku (16 × 10 cm) přibližně 30 ml roztoku. Do roztoku byl vložen hřeben pro 25 jamek.

Do první jamky bylo aplikováno 10 μl standardního vzorku DNA (Quick-Load<sup>®</sup> 100bp DNA Ladder, New England BioLabs). Do následujících jamek bylo pipetováno vždy

po 2  $\mu$ l PCR produktu. Elektroforéza byla provedena při napětí 110 V po dobu 30 minut. Jednotlivé agarosové gely byly vizualizovány pod UV světlem pomocí zobrazovacího zařízení (Molecular Imager® GelDoc™ XR+).

### 3.2.2.3 Příprava polyakrylamidového gradientového gelu a DGGE analýza

Byl připraven 500  $\mu$ l 10% roztok persulfátu amonného a 100 ml 40% akrylamidu (38 g akrylamidu a 2 g bis-akrylamidu). Pro elektroforézu připravených vzorků z kapitoly 3.2.2.1 (str. 38) byl použit denaturující gradientový polyakrylamidový gel. Gradient gelu byl vytvořen z roztoků, jejichž denaturační síla byla 35 % a 60 %. Složení roztoků s příslušnou denaturační silou je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4: Složení roztoků pro přípravu 25 ml polyakrylamidového gelu

Denaturační síla	35%	60%
40% akrylamid (ml)	5,560	5,560
50% TAE (ml)	0,500	0,500
Formamid (ml)	3,500	6,000
Močovina (g)	3,675	6,300
dH <sub>2</sub> O (ml)	12,250	9,500

Podle návodu byla sestavena aparatura pro DGGE. Aparatura byla naplněna polyakrylamidovým roztokem pomocí sady dvou spojených nádob s magnetickou míchačkou. Do nádoby blíž k výtoku byl nalit roztok s denaturační silou 60 %, do druhé roztok s denaturační silou 35 %. K oběma roztokům bylo přidáno 20  $\mu$ l TEMEDu a 200  $\mu$ l 10% amonium persulfátu a byla zapnuta magnetická míchačka. Jehla na konci plnicí trubičky byla umístěna mezi skla aparatury pro DGGE. Následně bylo spuštěno peristaltické čerpadlo s dávkovačem (PCD 21). Zhruba po 5 sekundách byly obě nádoby propojeny, aby mohl vzniknout gel s denaturačním gradientem. Po naplnění aparatury byl mezi skla vložen hřebínek a roztok byl nechán cca 45 minut polymerovat. Vznikl polyakrylamidový gel s denaturačním gradientem o rozměrech 17  $\times$  14 cm.

Během polymerace gelu byl připraven zbytek aparatury pro DGGE. Tank byl naplněn cca 7 litry 1% Tris–acetátového pufru (TAE, složení roztoku: 0,4M Tris, 0,2M kyselina octová, 0,01M EDTA) a zakryt víkem. Bylo spuštěno zahřívání pufru na 60 °C.

Aparatura s polyakrylamidovým gelem byla vložena do tanku naplněného předeřtým pufrům. Jednotlivé jamky byly propláchnuty pufrům. Do jamek bylo



aplikováno 29  $\mu$ l PCR produktů z kapitoly 3.2.2.1. (str. 38). Elektroforéza DGGE byla zahájena při napětí 30 V. Po dosažení teploty pufru 60 °C bylo napětí zvýšeno na 55 V. Elektroforéza DGGE probíhala 17–18 hodin.

Po ukončení DGGE byl gel vložen do plastové nádoby s 50 ml 1% TAE pufru. Bylo přidáno 5  $\mu$ l interkalačního barviva SYBR Green. Gel byl za stálého míchání barven 30 minut. Obarvený gel byl vizualizován pod UV světlem pomocí zobrazovacího zařízení (Molecular Imager® GelDoc™ XR+).

#### **3.2.2.4 Příprava a purifikace DGGE vzorků pro Sangerovo sekvenování**

Sangerovo sekvenování je metoda vyvinutá Frederickem Sangerem a jeho kolegy v roce 1977. Metoda je založená na ukončení řetězce fragmentu DNA značeným dideoxynukleotidtrifosfátem (ddNTP) [107]. Pro provedení metody jsou nezbytnou součástí reakce DNA templát, primer, DNA polymerasa, deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) a ddNTP. Ve zjednodušeném případě probíhají reakce ve 4 paralelních zkumávkách, kde každá v reakční směsi obsahuje vždy všechny složky reakce a jeden typ ddNTP. Dideoxynukleotidtrifosfát je modifikovanou bází s chybějící hydroxyskupinou na 3' uhlíku, zodpovědným za fosfoesterovou vazbu mezi jednotlivými nukleotidy řetězce. Po zařazení ddNTP do sekvence nově vzniklé DNA dojde k zastavení syntézy. Pro detekci jsou využívány fluorescenčně značené (dříve radioaktivně) ddNTP inkorporované vždy na konci řetězce. Při analýze DNA fragmentů se využívá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s vysokým rozlišením nebo kapilární elektroforéza. Postupným čtením zón na gelu (směrem nahoru) se získá sekvence nukleotidů a po jejím přepsání je získána původní nukleotidová sekvence templátu [108].

Podle fotografie z kapitoly 3.2.2.3 (str. 40) byly vybrány zajímavé zóny DNA (intenzita, přítomnost u různých osob, přítomnost pouze v některých vzorcích u téže osoby atd.). Tyto zóny byly vizualizovány pod UV světlem transluminátoru a z gelu opatrně vyříznuty, aby nedošlo ke kontaminaci jinou DNA. Vyříznuté zóny gelu byly přeneseny do 1,5ml mikrozkuvek a bylo přidáno 100  $\mu$ l sterilní vody. Mikrozkuvky byly krátce promíchány na Vortexu. Dále byly 10 minut centrifugovány (MSE Sanyo HAWK 15/05 Refrigerated Centrifuge) při 12444 $\times$  g a laboratorní teplotě.

Dále byla u vzorků amplifikována DNA pomocí PCR reakce. Složení PCR směsi pro provedení reakce je uvedeno v Tabulce 5 (str. 42).

Tabulka 5: Složení PCR směsi (jeden vzorek) pro amplifikaci DNA z kousku gelu

Složka	V [ $\mu$ l]
Templát DNA	5
PCR mix	15
Primer 341FP	1
Primer 534RP	1
dH <sub>2</sub> O	8

**Poznámka:** Templát DNA – sterilní voda s extraktem z vyříznuté zóny polyakrylamidového gelu, PCR mix (One Taq<sup>®</sup> Quick-Load<sup>®</sup> 2× Master Mix with Standard Buffer, New England BioLabs) PCR mix obsahuje: 20mM Tris-HCl (pH 8.9 při 25 °C), 22mM KCl, 22mM NH<sub>4</sub>Cl, 1.8mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dGTP, 0.2mM dTTP, 5% Glycerol, 0.06% IGEPAL<sup>®</sup> CA-630, 0.05% Tween<sup>®</sup> 20, 1× Xylen cyanol, 1× Tartrazin, 25 U/ml OneTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, 10 $\mu$ M „Forward“ primer 341 FP (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 10 $\mu$ M „Reverse“ primer 534 RP (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3').

Bylo využito stejného programu PCR „cycleru“ jako pro amplifikaci vzorků při analýze DGGE v kapitole 3.2.2.1 viz. Tabulka 3 (str. 39).

Úspěšnost amplifikace byla ověřena na agarosové elektroforéze stejně jako v předchozím případě. Amplifikovaná DNA byla přečištěna pomocí komerční soupravy „Monarch<sup>®</sup> PCR & DNA Cleanup Kit (5  $\mu$ g)“ od firmy New England Biolabs (dále pouze NEB Monarch).

K 28  $\mu$ l DNA bylo přidáno 140  $\mu$ l „DNA Cleanup Binding Buffer“ (ředění 1 : 5) a vše bylo promícháno pipetou. Ředěná DNA byla aplikována na kolonku umístěnou na čisté mikrozkuhavce a byla provedena 1minutová centrifugace (Hermle Z216 MK) při 16060 $\times$  g. Mikrozkuhavka byla vyprázdněna a na kolonku bylo pipetováno 200  $\mu$ l „DNA Wash Buffer“ a opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Tento krok byl opakován ještě jednou. Dále byla kolonka umístěna na novou 1,5ml mikrozkuhavku a bylo na ni aplikováno 20  $\mu$ l „DNA Elution Buffer“. DNA se z kolonky uvolnila do 1 minuty, následovala 1minutu centrifugace při 16060 $\times$  g. Na závěr byla změřena koncentrace purifikované DNA na přístroji NanoDrop One<sup>C</sup>.

Pro sekvenování bylo do 200 $\mu$ l mikrozkuhovek aplikováno 50 ng purifikované DNA. Každý vzorek purifikované DNA byl takto připraven do 2 mikrozkuhovek. Dále bylo přidáno 2,5  $\mu$ l 10 $\mu$ M primeru (do 1. mikrozkuhoveky „Forward“ primer 341FP a do 2. mikrozkuhoveky „Reverse“ primer 534RP) a objem v mikrozkuhovekách byl doplněn dH<sub>2</sub>O na 10  $\mu$ l. Takto připravené vzorky byly odeslány ke komerčnímu sekvenování (Sangerovo sekvenování) do firmy SEQme s.r.o..

### 3.2.3 Analýzu mikrobiální diverzity za použití „Next generation sequencing“

V současné době existuje celá řada technologických provedení NGS (z angl. „next generation sequencing“). Jejich společným rysem je možnost sekvenovat paralelně miliony krátkých fragmentů DNA. [109]. Kromě paralelního sekvenování mají NGS metody řadu výhod oproti starším metodám (Sangerovo sekvenování, pyrosekvenování). Hlavními výhodami jsou rychlost, nižší finanční náročnost na získané množství dat a přesnost výsledků. Jako NGS jsou označovány sekvenování 2., 3. a 4. generace. Sekvenování 2. generace je založeno na cyklickém přidávání bází na templát a jejich snímání. Rozdíl mezi jednotlivými platformami je v použitých chemikáliích a v detekčních metodách. Mezi hlavní platformy tohoto typu sekvenování patří Ion Torrent, Solexa (často nazývané Illumina), SOLiD, 454 (Roche) [110].

V této práci bylo použito sekvenování 2. generace za využití platformy Ion Torrent od firmy ThermoFisher Scientific. Tato technologie využívá iontově polovodičové sekvenování, pro které je nutné připravit knihovnu DNA. Při přípravě se využívá emulzní PCR, která spočívá v navázání jednotlivých DNA templátů na kuličky „AmpureBeads“. Ty jsou následně rozprostřeny do mikrojamek sekvenačního polovodičového čipu. V procesu sekvenace jsou k templátům střídavě připouštěny neznačené dNTP. V případě, že dojde k inkorporaci báze do nově vznikajícího vlákna DNA, je uvolněn protonový ion ( $H^+$ ). Tento  $H^+$  ion změní hodnotu pH roztoku, která je zachycena detektorem a zaznamenána. Pro začlenění dNTP do nového vlákna je nutná přítomnost DNA polymerasy [110].

#### 3.2.3.1 Příprava PCR amplikonů

Pro přípravu PCR amplikonů bylo využito metodiky popsané v práci autorů Fliegerová a kol. [111].

Nejprve byla za pomoci PCR amplifikována bakteriální DNA získaná z lidských fekálních vzorků, jejichž zpracování je uvedeno v kapitole 3.2.1 (str. 37). Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tabulce 6 (str. 44).

Tabulka 6: Složení směsi PCR pro přípravu jednoho amplikonu

Složka směsi	V [μl]
Bakteriální DNA	1
PCR Master Mix	15
Primer BactBF	1
Primer BactBR	1
dH <sub>2</sub> O	12

**Poznámka:** PCR Master Mix (EliZyme HS Robust MIX Red, Elisabeth® Pharmacon) – složení: enzymy, 2mM dNTPs, 6mM MgCl<sub>2</sub>, červené barvivo, pufr, „Forward“ Primer BactBF (5'-GGATTAGATACCCCTGGTAGT-3'), „Reverse“ Primer BactBR (5'-CACGACACGAGCTGACG-3').

Amplifikace byla provedena za podmínek uvedených v Tabulce 7. Dále byla provedena kontrola pomocí agarosové elektroforézy viz. kapitola 3.2.2.2 (str. 39). Při úspěšné amplifikaci byly získány amplikony o velikosti 300 bp. Ty byly dále purifikovány komerčním kitem NEB Monarch. Postup purifikace je uveden v kapitole 3.2.2.4 (str. 41).

Tabulka 7: Podmínky PCR amplifikace bakteriální DNA pro přípravu amplikonů

Krok	T [°C]	T [s]	Cykly
1	95	300	-
2	95	30	25×
3	57	30	
4	72	30	
5	72	300	-
6	12	∞	-

### 3.2.3.2 Příprava knihovny pro NGS

Přípravu knihovny lze rozdělit do 6 pomyslných kroků (oprava konců dsDNA, ligace adaptéru, 2 purifikace dsDNA, amplifikace knihovny a ředění–kvantifikace knihovny). Pro přípravu knihovny vzorků byla použita komerční souprava „NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent™ (E6270L)“. Dále byly použity barkódy (IonExpress, Life Technologies), které byly ředěny deionizovanou vodou v poměru 1 : 1.

#### I. Oprava konců – „End repair“

Pro opravu konců dsDNA bylo použito poloviční množství materiálu, než je doporučeno výrobcem. Objemy složek směsi pro úpravu jednoho vzorku jsou uvedeny v Tabulce 8 (str. 45). Dále byla směs pipetována po 25 μl do jamek 96jamkové destičky. Do každé jamky

bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  dsDNA připravené v kapitole 3.2.3.1 (str. 43). Destička byla vložena do PCR „cycleru“ nastaveného na 20 minut zahřívání při teplotě 25 °C a 10 minut při 70 °C, závěrečnou fází bylo vypnutí programu a následné chlazení při 8 °C.

Tabulka 8: Složení směsi pro opravu konců dsDNA

Složka	V [ $\mu\text{l}$ ]
ER pufr	3
ER enzym	1,5
dH <sub>2</sub> O	20,5

**Poznámka:** ER pufr – „End Repair Reaction Buffer“ (BioLabs Inc., NewEngland), ER enzym – „End Repair Enzyme Mix“ (BioLabs Inc., NewEngland).

## II. Ligace adaptéru a barkódů

Dále byly k opraveným amplikonům dsDNA ligovány adaptéry. Adaptér je krátký oligonukleotid, který se váže na jeden z tupých konců opravené dsDNA a umožňuje vazbu jednoho barkódu na druhý tupý konec dsDNA. Barkód je krátká unikátní sekvence, která označuje konkrétní templát v knihovně všech vzorků. Díky tomuto úseku jsou při konečné analýze rozpoznány jednotlivé vzorky DNA.

Nejprve byla připravena směs enzymů, pufru a adaptéru P1. Složení směsi pro přípravu jednoho vzorku je uvedeno v Tabulce 9. Připravená směs byla aplikována po 19  $\mu\text{l}$  do jamek se vzorky (viz. předchozí krok). Poté byl ke každému vzorku přidán 1  $\mu\text{l}$  unikátního barkódu. Destička se vzorky byla opět inkubována v PCR „cycleru“ nastaveném na 15 minut zahřívání při teplotě 25 °C a 5 minut při 65 °C, závěrečnou fází bylo vypnutí programu a následné chlazení při 8 °C.

Tabulka 9: Složení PCR směsi pro přípravu jednoho vzorku

Složka	V [ $\mu\text{l}$ ]
Pufr T4 ligasy	5
P1 adaptér	0,5
DNA polymerasa	0,5
T4 ligasa	2,5
dH <sub>2</sub> O	10,5

**Poznámka:** Všechny složky reakce jsou od výrobce New England BioLabs Inc., dH<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich).

## III. Purifikace DNA za použití kuliček „AmpureBeads“

Opravená dsDNA s ligovaným adaptérem a barkódem byla purifikována pomocí kuliček (AMPure XP, v angl. Ampure beads). K celkovému objemu 50  $\mu\text{l}$  v jamce bylo přidáno

60  $\mu\text{l}$  roztoku 1,2V kuliček, roztok byl promíchán a inkubován cca 5 minut za laboratorní teploty, aby došlo k navázání DNA na kuličky. Dále byla destička na 5 minut umístěna na magnet. Po uplynutí inkubační doby byl pomocí pipety odstraněn supernatant a bylo provedeno dvojnásobné promytí 180  $\mu\text{l}$  70% ethanolu. Ethanol vždy působil cca 1 minutu. V dalším kroku purifikace byl ethanol úplně odstraněn a kuličky byly 2–3 minuty sušeny na vzduchu. Po odstranění destičky z magnetu byla DNA vázaná na kuličky eluována do 50  $\mu\text{l}$  10mM Tris–HCl pufru. Roztok byl promíchán pipetou a na 2 minuty odstaven. Na závěr byla destička umístěna na magnet, do doby, než byl roztok čirý (cca 2 minuty). Supernatant obsahující purifikovanou DNA byl přenesen do nové 96jamkové destičky.

#### IV. Amplifikace knihovny

Po purifikaci následovala amplifikace dsDNA. Byla připravena PCR směs, jejíž složení pro přípravu jednoho vzorku je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10: Složení PCR směsi pro amplifikaci vzorků

Složka	V [ $\mu\text{l}$ ]
Primery	2
2× PCR Master Mix	25

**Poznámka:** Primery (NEBNext Library Primers for Ion Torrent, New England BioLabs Inc.), PCR Master Mix (NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix, New England BioLabs Inc.).

Do nové 96jamkové destičky byla směs pipetována po 27  $\mu\text{l}$ . Do každé jamky bylo přidáno 23  $\mu\text{l}$  purifikovaných vzorků dsDNA z předchozího kroku. Byla provedena PCR amplifikace. Nastavení použitého programu je uvedeno v Tabulce 11.

Tabulka 11: Podmínky PCR pro amplifikaci vzorků

Krok	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	T [s]	Cykly
1	98	30	-
2	98	10	7×
3	58	30	
4	72	30	
5	72	300	-

#### V. Purifikace DNA za použití kuliček „AmpureBeads“

Následujícím krokem byla opět purifikace vzorků. Postup provedení je uveden v *bodě III.* (str. 45).

## VI. Ředění knihovny a její kvantifikace

Posledním krokem přípravy celé knihovny bylo ředění pro její kvantifikaci. Nejprve byly všechny vzorky ředěny 10mM Tris–HCl pufrům v poměru 1 : 20. Do další 96jamkové destičky byly tyto vzorky přeneseny tak, aby vzniklo konečné ředění 1 : 1000 (bylo provedeno ředění 1 : 50 již ředěných vzorků 1 : 20). Do poslední 96jamkové destičky byly vzorky ředěny 1 : 5000. Kvantifikace knihovny byla provedena dle protokolu ke komerční soupravě „KAPA Library Quantification Kit Ion Torrent™ Platforms“ od firmy Roche.

Nejprve byla připravena reakční směs pro kvantitativní PCR (qPCR). Pro analýzu jednoho vzorku bylo potřeba 5  $\mu$ l „KAPA SYBR FAST qPCR Master Mixu (2 $\times$ )“, 1  $\mu$ l Ion Torrent Primer Mix (10 $\times$ )“ a 0,2  $\mu$ l „50 $\times$  KSF ROX Low“ (všechny reakční složky jsou od výrobce KAPABIOSYSTEMS, Roche). Připravená reakční směs byla pipetována do 96jamkové destičky. Do třech jamek byly přidány 4  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O, tyto jamky byly pouze kontrolní, bez přidaného teplátů. Do 6 jamek bylo přidáno po 4  $\mu$ l DNA standardu (koncentrace jednotlivých vzorků jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Koncentrace vzorků DNA standardu pro vyhodnocení qPCR

DNA Standard	Koncentrace [pM]
1	83
2	8,3
3	0,83
4	0,083
5	0,0083
6	0,00083

**Poznámka:** Výrobce vzorků DNA Standardu je KAPABIOSYSTEMS, Roche.

Do zbylých jamek bylo aplikováno po 4  $\mu$ l 1 : 5000 ředěných roztoků obsahujících bakteriální DNA. Destička byla vložena do qPCR „cycleru“ (QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Instrument, ThermoFisher Scientific) a byl spuštěn PCR program, jehož průběh je uveden v Tabulce 13.

Tabulka 13: Nastavení programu qPCR

Krok	T [°C]	t [s]	Cykly
1	95	300	-
2	95	30	35 $\times$
3	60	45	
4	65–95	$\infty$	-

**Poznámka:** Krok 1 – počáteční denaturace, krok 2 – denaturace, krok 3 – nasednutí primer, krok 4 – analýza křivky tání, kroky 2 a 3 jsou opakovány pro amplifikaci DNA.

Získaná data byla zpracována pomocí počítačového softwaru „QuantStudio“ a převedena do programu Microsoft Excel, kde byly dopočítány poměry ředění jednotlivých vzorků. Dále byly všechny vzorky knihovny (1 : 20, 1 : 1000, 1 : 5000) ředěny dH<sub>2</sub>O tak, aby výsledná koncentrace v jamce byla 30pM. Na závěr bylo z každého vzorku odebráno po 1 µl a převedeno do společné mikrozkušavky. Mikrozkušavka s obsahem této směsi byla finální knihovnou pro metodu NGS. Tato mikrozkušavka byla skladována v lednici. 96jamkové destičky s ředěnými vzorky byly uloženy při –20 °C.

### 3.2.3.3 Příprava templátu pro NGS

Templát pro NGS byl připraven za použití komerční soupravy „Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (sada obsahuje: Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Solutions, Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Supplies)“ od firmy ThermoFisher Scientific. Podrobnější návod přípravy templátu je uveden na internetové adrese [112]: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014579\\_IonPGM\\_HiQ\\_View\\_OT2\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014579_IonPGM_HiQ_View_OT2_UG.pdf).

Pro práci byl použit přístroj firmy ThermoFisher Scientific „Ion OneTouch 2 System“, složený ze 2 modulů: „Ion OneTouch 2 Instrument“ a „Ion OneTouch ES (Enrichment System)“. Na modulu „Ion OneTouch 2 Instrument“ byla nastavena metoda „PGM: Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit-400“. Dále byly do příslušných částí vloženy mikrozkušavky typu „Recovery Tube“ se 150 µl „Breaking Solution“. Mezi mikrozkušavky byl vložen můstek (rotor) typu „Recovery Router“. Do přístroje byla umístěna amplifikační destička typu „Amplification Plate“ a do ventilu přístroje byla vložena vstříkovací tryska. Dále byly na příslušné pozice našroubovány zkumavky typu „Reagent Tube“ (jedna byla naplněna z 1/2 olejem a druhá z 1/4 roztokem „Recovery Solution“) a kontejner na odpad. Do 2ml mikrozkušavky obsahující 800 µl roztoku „Ion PGM™ Hi-Q™ View Reagent Mix“ byly přidány v přesném pořadí další roztoky, jak je uvedeno v Tabulce 14. Takto byl připraven amplifikační roztok.

Tabulka 14: Reagencie přidané do mikrozkušavky s 800 µl „View Reagent Mix“

Pořadí	Reagencie	V [µl]
1	„Nuclease-free Water“	25
2	„Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzyme Mix“	50
3	Ředěná knihovna (30pM)	25
4	„Ion PGM™ Hi-Q™ View ISP“	100

**Poznámka:** „Ion PGM™ Hi-Q™ View ISP“ je potřeba před použitím 1 minutu promíchat na Vortexu a poté ještě pipetou.



Před samotným spuštěním amplifikace templátu byl naplněn a nainstalován filtr typu „Reaction Filter“. Do vstupu pro vzorek bylo aplikováno po 1 ml amplifikačního roztoku. Poté bylo přidáno dvakrát po 850 µl reakčního oleje „Reaction Oil“. Filtr byl vložen na svou pozici v přístroji a byla spuštěna cca 16hodinová amplifikace templátu.

Po uplynutí cca 16 hodin byla zastavena amplifikace a s ní i centrifugace probíhající v mikrozkuvkách „Recovery Tube“. V obou mikrozkuvkách bylo ponecháno 100 µl roztoku „Recovery Solution“, zbytek byl odstraněn pipetou. Do každé mikrozkuvky bylo přidáno 500 µl roztoku „Wash Solution“ a vše bylo promícháno pipetou pro rozptýlení ISP (z angl. „Ion Sphere Particles“). Roztoky z obou mikrozkuvek byly převedeny do nové 1,5ml mikrozkuvky. Tato mikrozkuvka byla 2,5 minuty centrifugována při 15 500× g. Supernatant byl odebrán a v mikrozkuvce bylo ponecháno pouze 100 µl s peletou.

Do speciálního 8jamkového „stripu“, který byl později vložen do modulu „Ion OneTouch ES“, byla připravena sada roztoků. Seznam roztoků s příslušným objemem v jednotlivých jamkách je uveden v Tabulce 15.

Tabulka 15: Seznam roztoků v 8jamkovém „stripu“

Č. jamky	Roztok	V [µl]
1	Roztok 1	100
2	Roztok 3	300
3	„Ion One Touch™ Wash Solution“	300
4	„Ion One Touch™ Wash Solution“	300
5	„Ion One Touch™ Wash Solution“	300
6	-	-
7	Roztok 2	143
8	-	-

Roztok 1 (ISP) byl před aplikováním do jamky promíchán pipetou. Roztok 2 („Melt-Off Solution“) byl připraven kombinací 280 µl roztoku „Tween™ Solution“ a 40 µl 1M hydroxidu sodného. Roztok 3 („Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1Beads“) byl připraven z „Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1Beads“ roztoku, který byl 30 vteřin resuspendován na Vortexu a poté byla tmavá peleta kuliček resuspendována pipetou. Po resuspendování pelety bylo 13 µl roztoku přeneseno do nové 1,5ml mikrozkuvky. V dalším kroku byla mikrozkuvka umístěna na 2 minuty na magnetický stojánek. Po uplynutí 2 minut byl opatrně odstraněn supernatant a bylo přidáno 130 µl roztoku

„MyOne™ Beads Wash Solution“. Poté byla mikrozkušavka krátce promíchána na Vortexu.

V závěrečném kroku celé přípravy templátu byla do modulu „Ion OneTouch ES“ vložena 0,2ml PCR mikrozkušavka naplněná 10  $\mu$ l neutralizačního roztoku „Neutralization Solution“. Po nasazení nové pipetovací špičky byl do modulu umístěn 8jamkový „strip“. Poté byl modul spuštěn. Zhruba po 35 minutách byla příprava ukončena, bylo zkontrolováno, zda PCR mikrozkušavka obsahuje roztok s ISP. Roztok byl ihned promíchán, cca 5 $\times$  otočením mikrozkušavky. Nakonec byl odstraněn 8jamkový „strip“ a špička a přístroj „Ion OneTouch 2 Systém“ byl vyčištěn.

#### **3.2.3.4 Sekvenování připraveného templátu**

Pro sekvenování připraveného templátu z kapitola 3.2.3.3 (str. 48) byla použita komerční souprava „Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (sada obsahuje: Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Solutions, Ion PGM™ Seq Supplies)“ od firmy ThermoFisher Scientific. Sekvenování bylo prováděno na přístroji „Ion PGM™ System“. Podrobnější manuál pro sekvenování templátu a o obsluze přístroje je dostupný na internetovém odkazu [113]: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014583\\_IonPGM\\_HiQ\\_View\\_Sequenc\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014583_IonPGM_HiQ_View_Sequenc_UG.pdf).

Před zahájením práce byl přístroj „Ion PGM™ System“ vyčištěn za použití 18 M $\Omega$  vody. Po vyčištění přístroje byl zkontrolován tlak v rezervoáru a byly připraveny lahve se zásobními roztoky pro sekvenování. Do vypláchnuté zásobní lahve (2) byly natočeny cca 2 litry 18 M $\Omega$  vody a byl přidán celý objem lahvičky s roztokem „Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing W2 Solution“. Na závěr bylo do lahve přidáno 70  $\mu$ l 100mM hydroxidu sodného a vše promícháno. Do vypláchnuté zásobní lahve (1) bylo pipetováno 350  $\mu$ l čerstvě připraveného 100mM hydroxidu sodného. Do zásobní lahve (3) bylo nalito 50 ml roztoku „Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing W3 Solution“. Všechny tři lahve byly nainstalovány na své pozice v přístroji. Dále byla zapnuta inicializace přístroje, při které si přístroj automaticky nastavil pH roztoku v zásobní lahvi (2).

Do 50ml lahviček pro reagentie bylo pipetováno po 20  $\mu$ l roztoků dGTP, dCTP, dATP a dTTP. Lahvičky byly zazátkovány a našroubovány do přístroje. Přístroj do všech lahviček automaticky doplnil po 40 ml roztoku W2 ze zásobní lahve (2).

V dalším kroku byl naplněn čip „Ion 316™ Chip v2 BC“. Nejprve byl na Vortexu rozmíchán vzorek kontroly „Control Ion Sphere™ Particles“ a poté bylo 5  $\mu$ l této ISP kontroly přidáno do 0,2ml PCR mikrokumavky obsahující templát ISP (příprava viz. kapitola 3.2.3.3, str. 48). Objem mikrokumavky byl promíchán pipetou a poté centrifugován 2 minuty při 15 500 $\times$  g. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a v mikrokumavce bylo ponecháno cca 15  $\mu$ l roztoku. Bylo přidáno 12  $\mu$ l primeru „Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Primer“ a roztok byl promíchán pipetou. Mikrokumavka byla vložena do PCR „cyklu“ nastaveného na 2 minuty zahřívání při teplotě 95 °C a následně 2 minuty při 37 °C. Po nasednutí primeru byly do PCR mikrokumavky přidány 3  $\mu$ l polymerasy „Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Polymerase“. Roztok byl promíchán pipetou a 5 minut inkubován při laboratorní teplotě. Během inkubace finálního roztoku pro sekvenování byl připraven čip. Nejprve z něho byla pomocí pipety odsáta tekutina, čip byl centrifugován a byla provedena kontrola, že neobsahuje žádné zbytkové tekutiny. Poté byl celý objem (30  $\mu$ l) ISP roztoku z PCR mikrokumavky aplikován na čip. Čip byl centrifugován ve stolní minicentrifuze, nejprve 0,5 minuty směrem ke středu a poté 0,5 minuty směrem od středu. Po centrifugaci byl roztok z čipu odsát pipetou a vrácen zpět. Po další 5vteřinové centrifugaci došlo k odstranění přebytečné tekutiny. Na závěr byl v počítačovém softwaru nastaven plán sekvenace, čip byl vložen do přístroje a bylo zahájeno sekvenování vzorků.

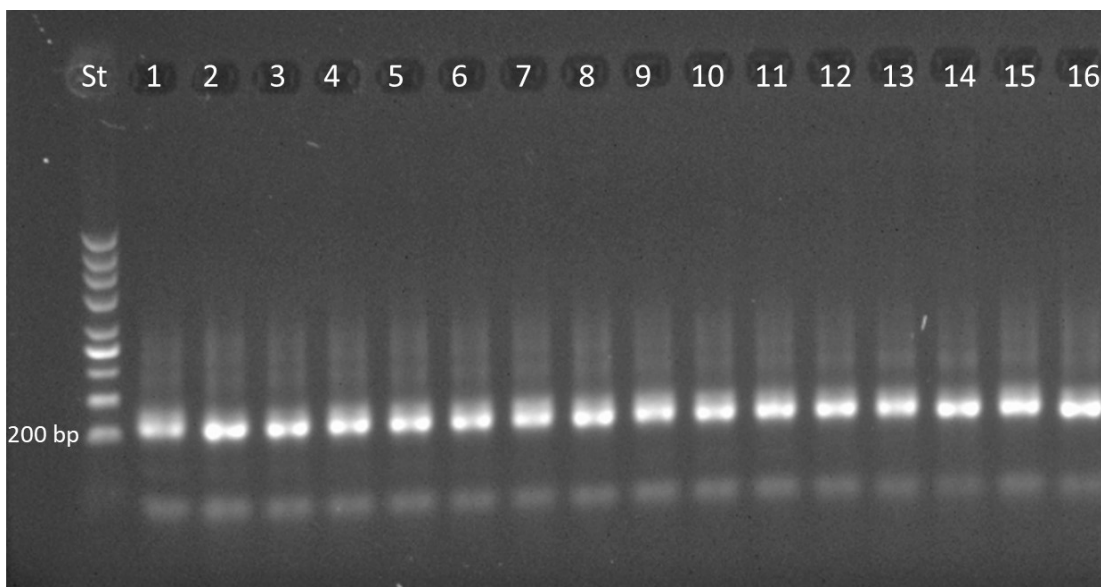
Data byla vyhodnocena v programu QIIME 2 (z angl. „Quantitative Insights Into Microbial Ecology“). Celé vyhodnocení bylo provedeno ve virtuálním prostředí Linuxu. Návody pro práci v programu QIIME 2 jsou dostupné na internetové adrese [www.qiime2.org](http://www.qiime2.org) [114].

## 4 Výsledky

Níže jsou popsány získané výsledky studie vlivu KPP na lidský střevní mikrobiom. Nejprve byl pozorován vliv KPP na biodiverzitu bakterií na základě polyakrylamidového gelu. Následovala identifikace některých druhů střevních bakterií pomocí Sangerova sekvenování. Poté byla provedena metoda NGS s následnou analýzou všech mikrobiomů dárců. Na závěr byly získané výsledky biodiverzity statisticky zpracovány pomocí analýzy hlavních koordinát a počtu operačních taxonomických jednotek.

### 4.1 Kontrolní agarosová elektroforéza

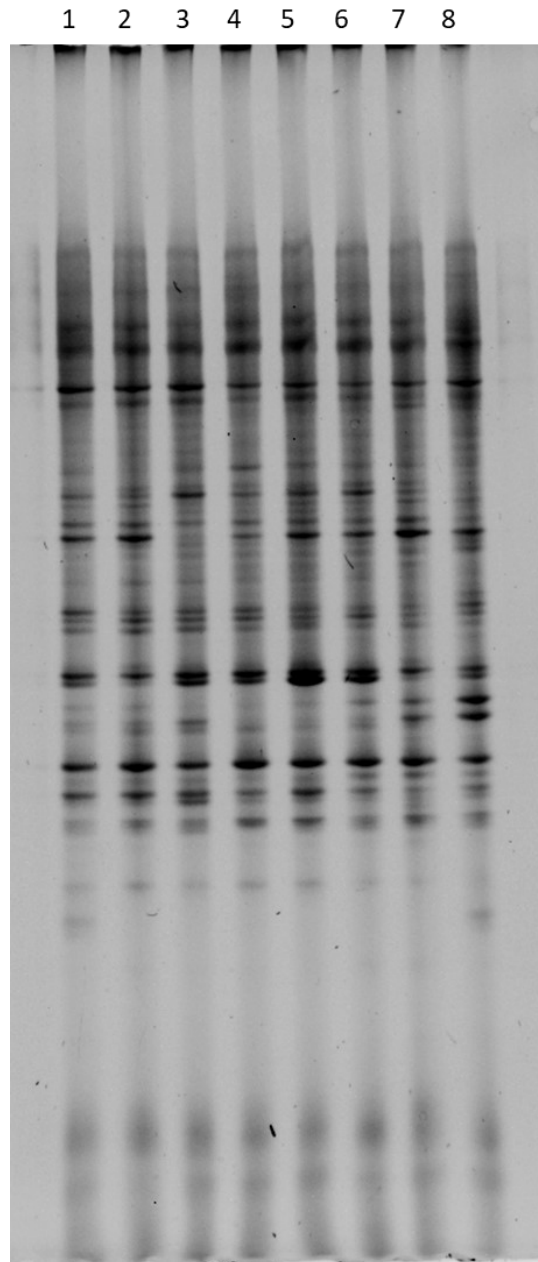
Během práce byla po každé amplifikaci DNA kódující gen pro 16S rRNA provedena kontrolní agarosová elektroforéza. Smyslem této elektroforézy bylo ověřit, zda došlo k dostatečné amplifikaci požadovaného úseku DNA. Pokud by některý vzorek neposkytl zónu o velikosti 200 bp, jednalo by se o nedostatečnou amplifikaci. Nedostatečná amplifikace by zásadně ovlivnila následně použité metody. Na Obrázku 3 je reprezentativní agarosový gel znázorňující přítomnost zóny o velikosti 200 bp, která se vyskytla u všech vzorků.



**Obrázek 3:** Fotografie reprezentativního agarosového gelu pro kontrolu přítomnosti zóny o velikosti 200 bp dokazující dostatečnou amplifikaci DNA kódující gen pro 16S rRNA. V dráze označené St. je standardní vzorek DNA (Quick-Load® 200bp DNA Ladder), v dráze 1-16 jsou vzorky amplifikované bakteriální DNA získané z lidských fekálních vzorků.

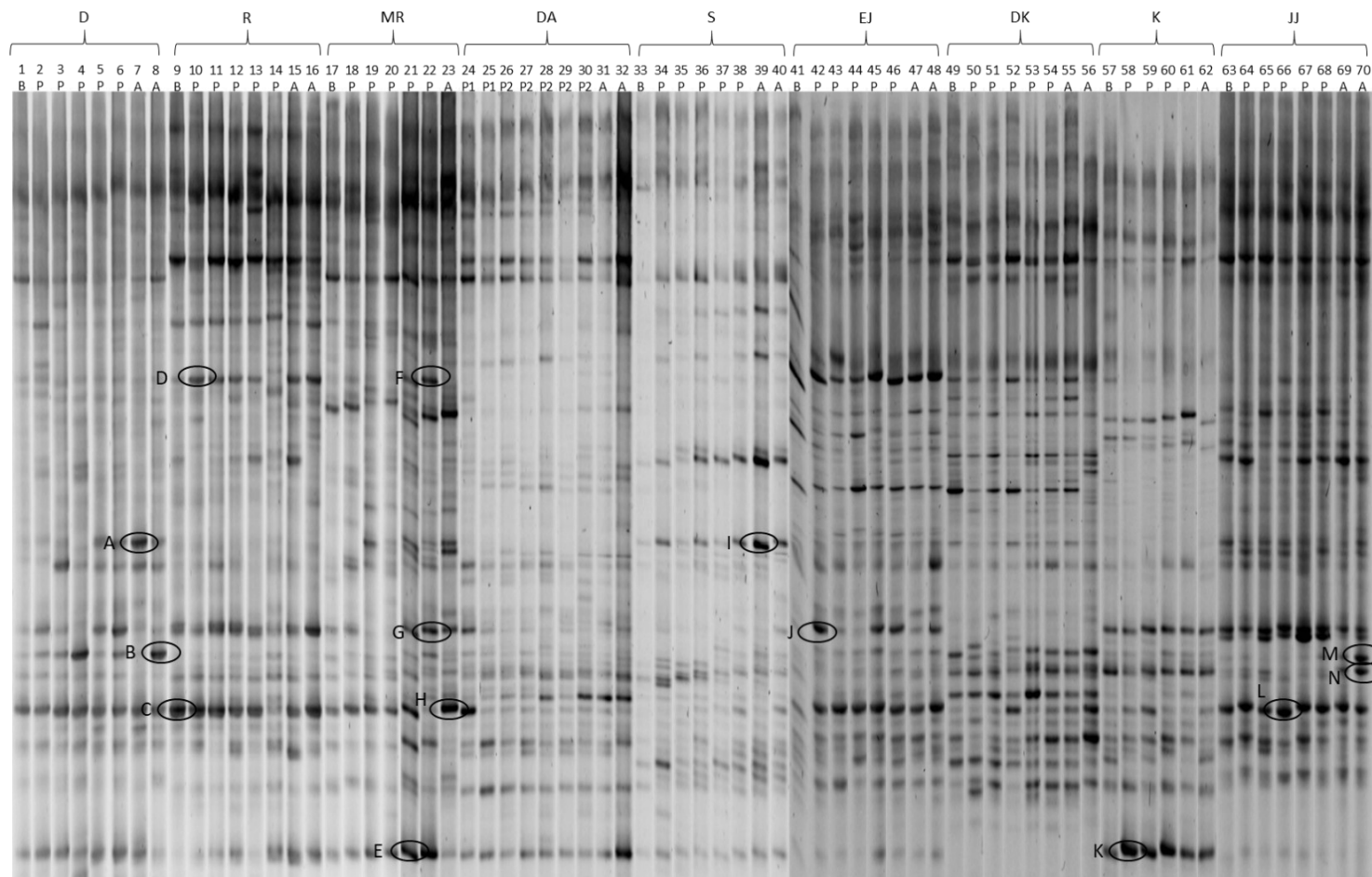
## **4.2 Vliv komerčních probiotických preparátů na biodiverzitu střevní mikroflóry zkoumaný metodou DGGE**

Pro základní zjištění vlivu KPP na biodiverzitu střevní mikroflóry u jednotlivých dárců bylo využito metody DGGE. Prvním krokem pro provedení metody byla izolace bakteriální DNA kódující gen pro 16S rRNA, která je společná všem druhům bakterií. Izolovaná DNA byla amplifikována metodou PCR. Amplifikovaná DNA byla podrobena vertikální elektroforéze v gradientovém denaturujícím polyakrylamidovém gelu. Jednotlivé gely byly dokumentovány a dále analyzovány. Analýza byla provedena pro každého dárce samostatně, zároveň byla uskutečněna celková analýza napříč všemi mikrobiomy. Na gelech se vzorky od jednoho dárce bylo sledováno, které zóny se objevují nebo naopak mizí, či jak se nemění v čase (před užitím, v průběhu užívání a po skončení užívání KPP). Na Obrázku 4 (str. 54) je jako příklad zobrazen gel jednoho dárce.



**Obrázek 4:** Fotografie polyakrylamidového gelu po provedené metodě DGGE. Pro ukázkou byl vybrán gel s obsahem bakteriální DNA z fekálních vzorků dárce JJ. Každá zóna reprezentuje jeden konkrétní druh bakterií, které jsou děleny na základě variabilních míst v konzervativním úseku 16S rRNA. V dráze č. 1 je vzorek odebraný před zahájením užívání KPP, v dráhách č. 2 až č. 6 jsou vzorky z průběhu užívání KPP, v dráze č. 7 a 8 jsou vzorky odebrané po ukončení užívání KPP.

Pro přehlednější porovnání mikrobiomů jednotlivých dárců mezi sebou byly DGGE gely složeny do jednoho Obrázku 5 (str. 55). Vzhledem k různé rychlosti jednotlivých elektroforéz byly zóny na gelech srovnány pomocí počítačového programu BioNumerics.



**Obrázek 5:** Porovnání polyakrylamidových DGGE gelů s amplifikovanou DNA pro gen 16S rRNA jednotlivých dárců. Fotografie vznikla složením a úpravou všech DGGE gelů pomocí počítačového programu BioNumerics. Písmena D, R, MR, DA, S, EJ, DK, K a JJ označují jednotlivé dárcce, čísla 1–70 označují dráhy na gelu. Písmena (B – před užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP) pod čísla drah označují dobu odběru fekálního vzorku, z kterého je izolována DNA. Zóny vyznačené kroužky a označeny písmeny A–N byly odeslány k Sangerovu sekvenování do komerční firmy SEQme. Identifikované bakteriální druhy jsou uvedeny v Tabulce 16 (str. 56).

### 4.3 Sangerovo sekvenování zvolených zón DGGE gelu

Všechny polyakrylamidové gely získané po provedení metody DGGE byly dále podrobněji studovány. Z gelů bylo vybráno několik významných zón (intenzita, přítomnost ve většině vzorků, vhodnost pro vyříznutí – dobře ohraničené), u kterých bylo provedeno Sangerovo sekvenování. Vybrané zóny byly vyříznuty z gelu pod UV lampou. DNA kódující gen pro 16S rRNA byla z vyříznutých kousků extrahována do dH<sub>2</sub>O a následně amplifikována pomocí PCR. Všechny připravené vzorky byly odeslány k provedení sekvenace do firmy SEQme.

Všechny sekvenované zóny jsou vyznačeny na Obrázku 5 (str. 55). Hlavním předpokladem pro vyhodnocení bylo, že zóny se stejnou vzdáleností od startu reprezentují stejný bakteriální druh. Pro ověření tohoto faktu byla provedena sekvenace odpovídajících si zón v různých vzorcích. Přehled identifikovaných bakteriálních druhů je uvedený v Tabulce 16. Uvedeny jsou pouze zóny s nejvyšší procentuální identitou pro daný druh bakterie. Zóny s nižší identitou jsou uvedeny v závorce bez procentuální hodnoty identity.

Tabulka 16: Přehled identifikovaných bakteriálních druhů metodou Sangerova sekvenování

Zóna	Název	Identita	ID v databázi
A (I)	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	98 %	NR_116168.1
B (M)	<i>Roseburia hominis</i>	83 %	NR_074809.1
F (D)	<i>Ruminococcus bromii</i>	86 %	NR_025930.1
H (C, L)	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	97 %	NR_028961.1
J (G)	<i>Eubacterium rectale</i>	97 %	NR_074634.1
K (E)	<i>Gemmiger formicilis</i>	97 %	NR_104846.1
N	<i>Kineothrix alysoides</i>	96 %	NR_156081.1

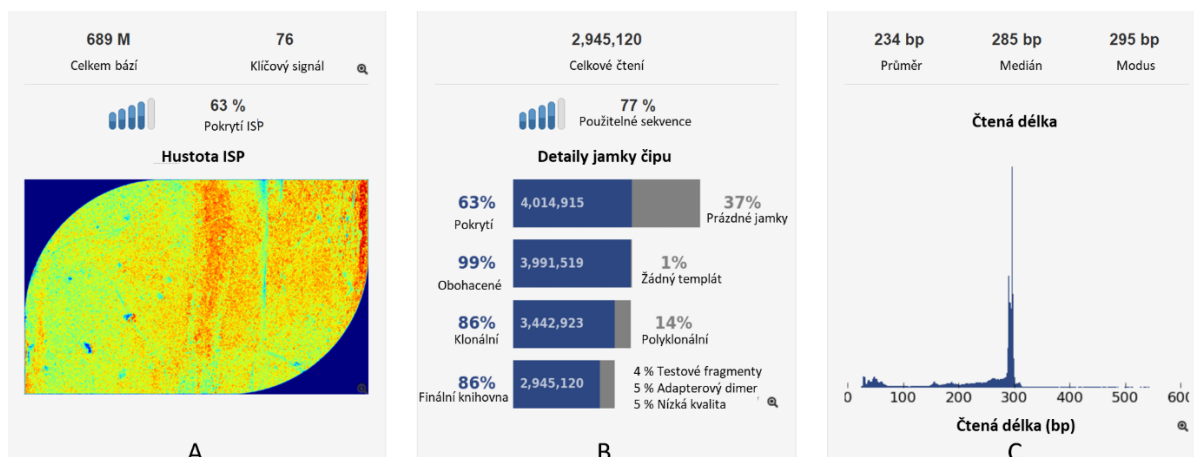
**Poznámka:** Všechny uvedené ID identifikovaných bakteriálních druhů pocházejí z databáze GenBank, která je součástí NCBI („National Center for Biotechnology Information“).

### 4.4 Relativní zastoupení bakteriálních čeledí ve střevním mikrobiomu dárců

Vliv užívaných KPP na bakteriální složení střevního mikrobiomu jednotlivých dárců byl též zkoumán za použití metody NGS (PGM Ion Torrent). Knihovna pro NGS byla připravena z izolované bakteriální DNA kódující gen pro 16S rRNA všech fekálních vzorků. Všechny parametry z provedené NGS metody jsou uvedeny na Obrázku 6 (str. 57). Pro analýzu pomocí NGS byl sekvenační čip pokryt z 63 % svého povrchu. Nanesené templáty byly z 86 % klonální, 14 % tvořily polyklonální templáty. Nejčastěji délka čtených fragmentů

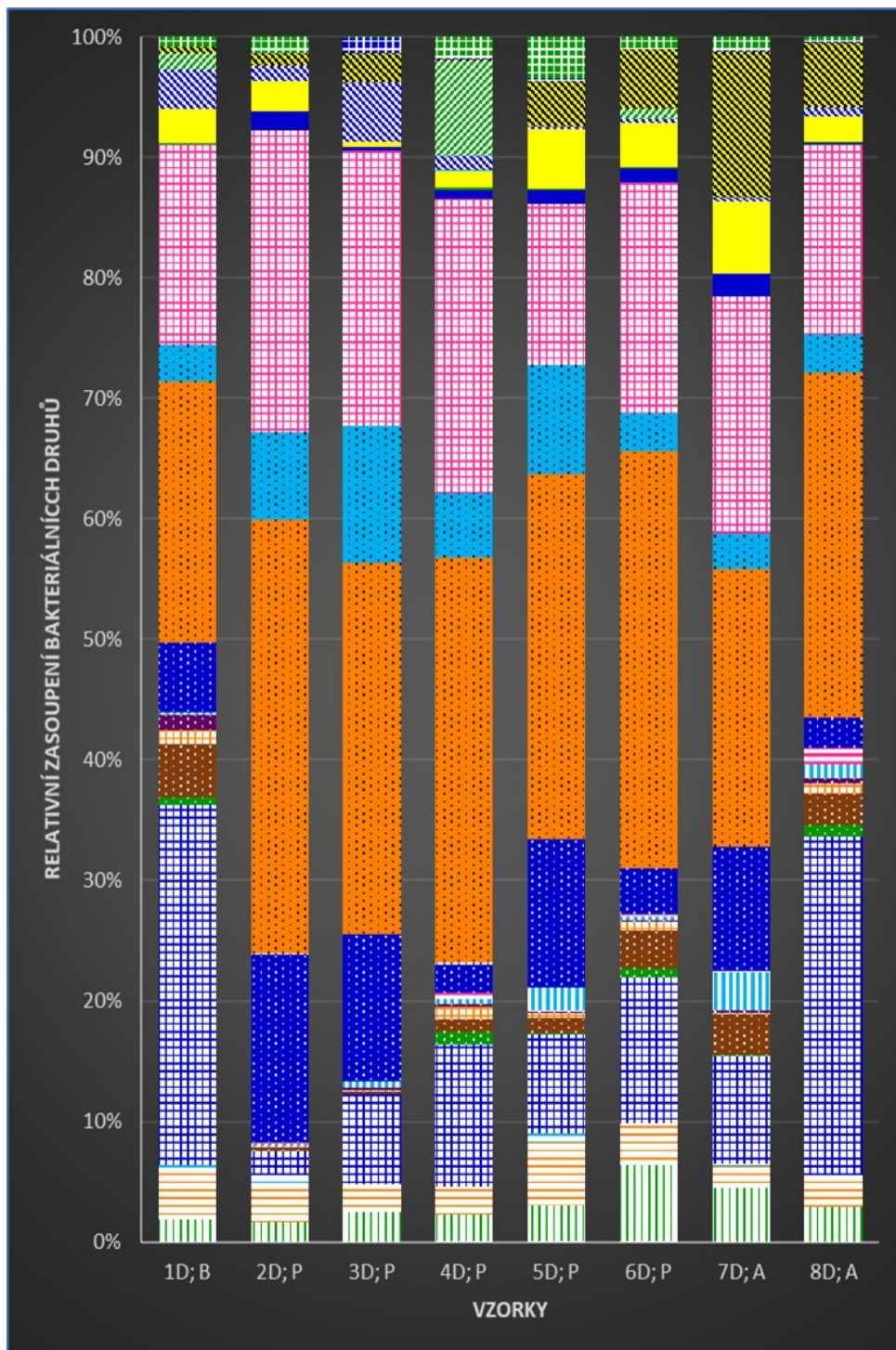


byla 295 bp. Uvedené parametry popisující připravenou knihovnu vypovídají o úspěšném a správném přípravě DNA knihovny.

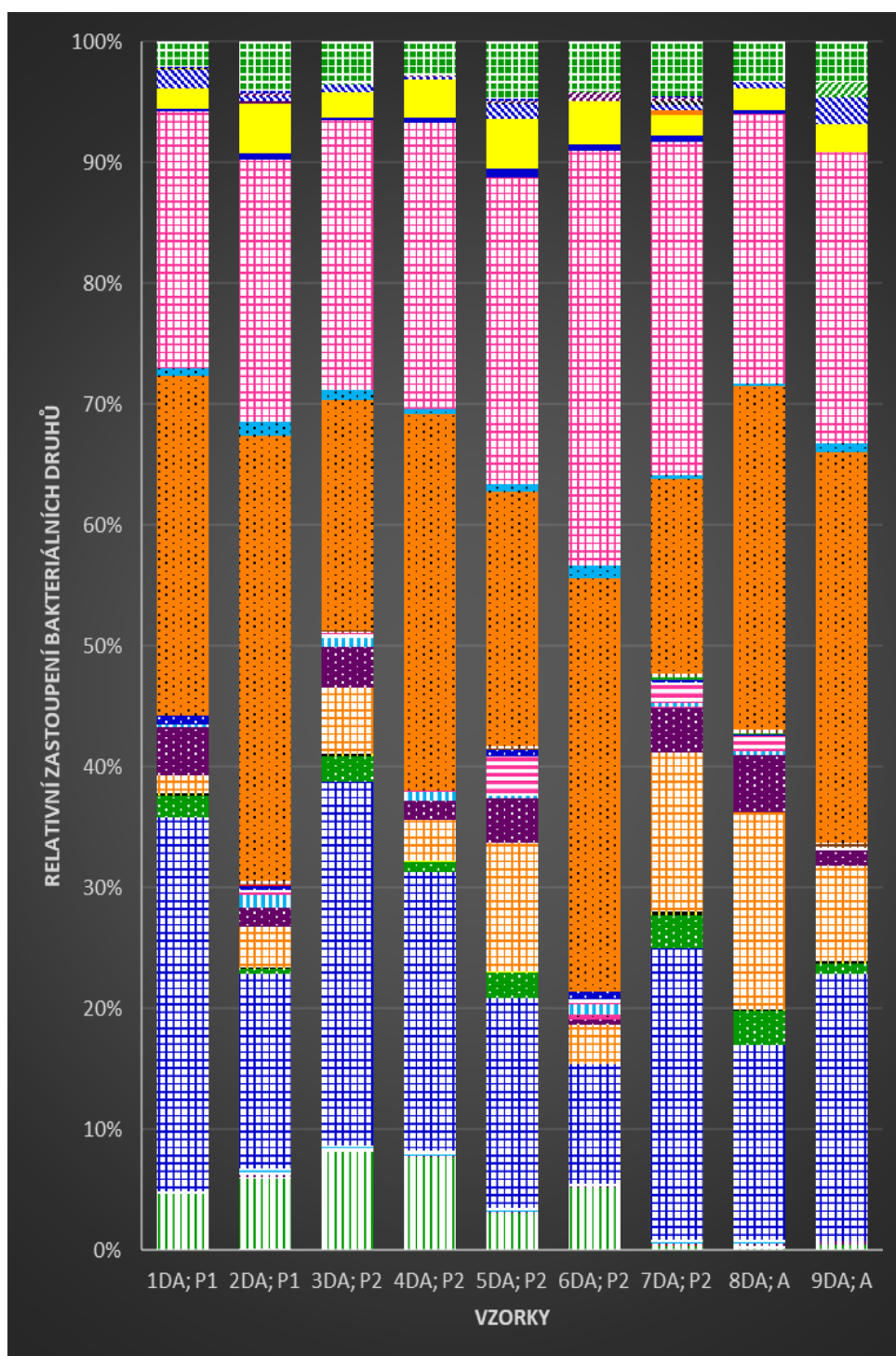


**Obrázek 6:** Parametry informující o provedené NGS metodě všech fekálních vzorků. Část A zobrazuje hustotu pokrytí čipu připravenou knihovnou ISP (z angl. „Ion Sphere Particles“), v části B jsou podrobnější informace (celkový počet čtení knihovny, počet pokrytých jamek knihovnou, počet jamek obsahující templát, počet klonálních a polyklonálních ISP) o připravené knihovně, v části C je záznam o čtených fragmentech a grafické rozložení všech detekovaných délek fragmentů.

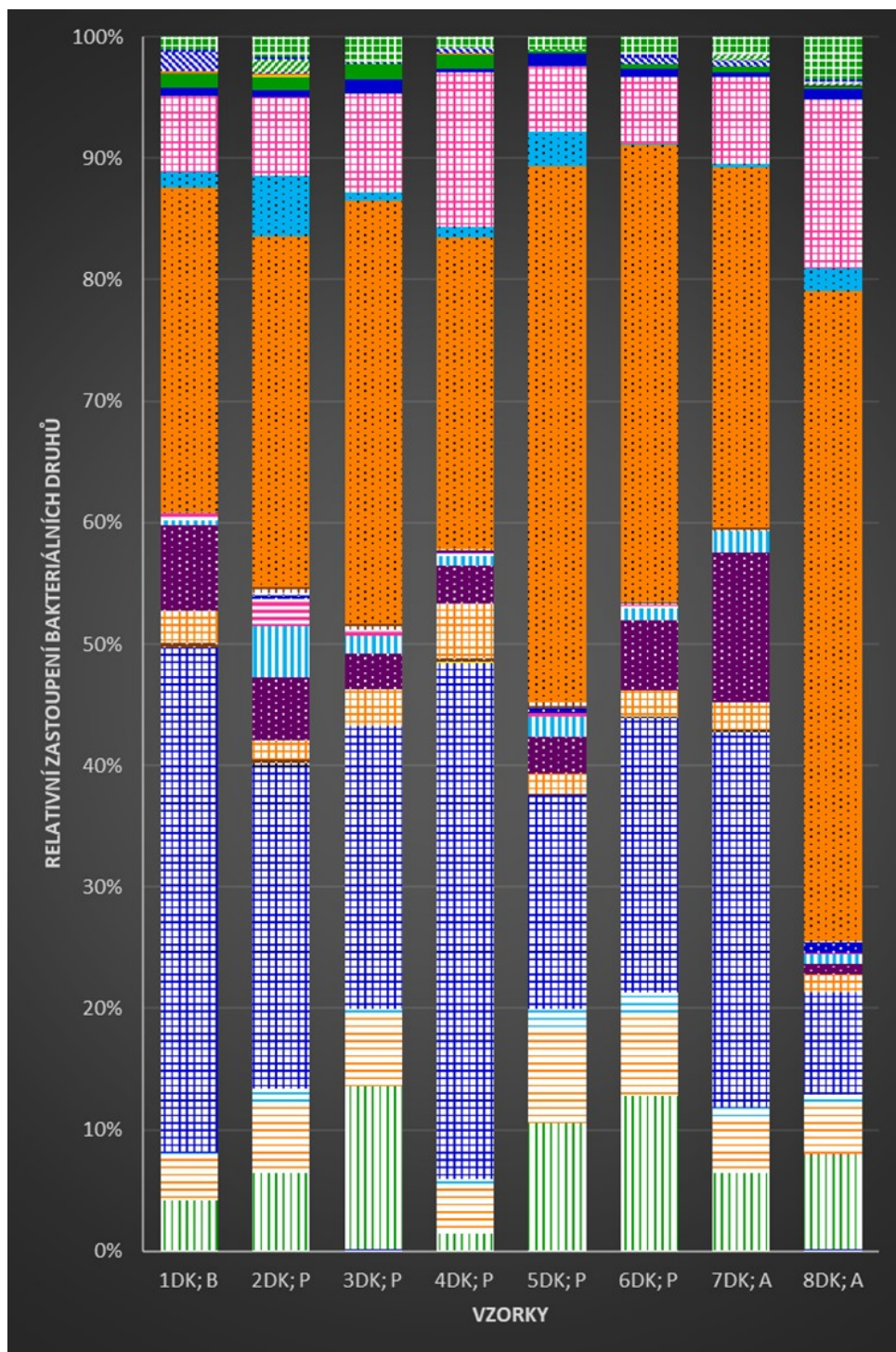
Data získaná po provedené NGS metodě informují o relativním zastoupení bakteriálních druhů v jednotlivých lidských fekálních vzorcích. Tabulky s těmito daty jsou součástí Přílohy 1 (str. 97). Relativní zastoupení bakteriálních druhů v jednotlivých fekálních vzorcích dárců bylo zpracováno do sloupcových grafů na Obrázcích 7–15 (str. 58–66). Společná legenda pro všechny sloupcové grafy je na Obrázku 16 (str. 67).



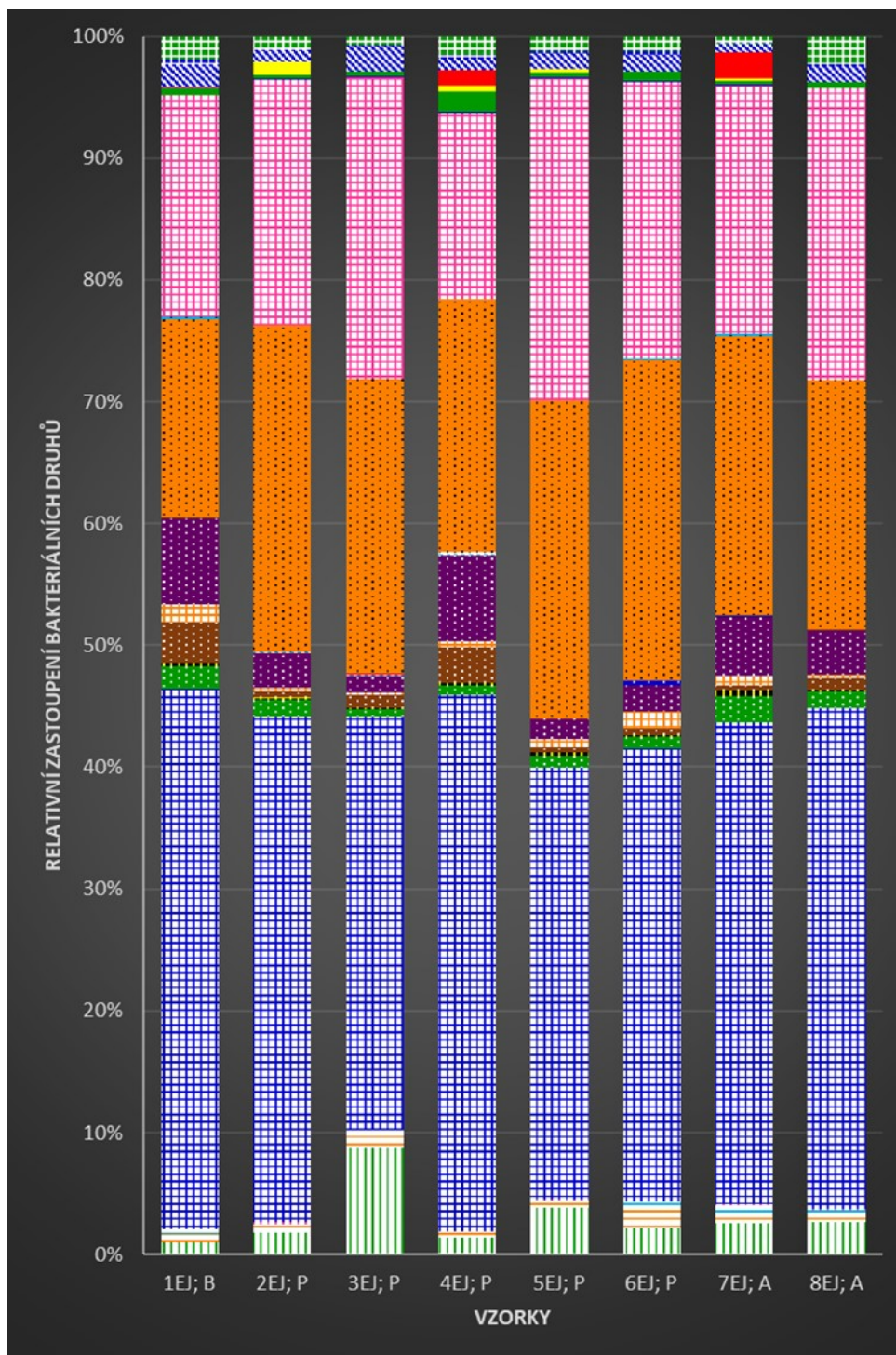
**Obrázek 7:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce D. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose x jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2D; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 7D; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a 10 dní po něm byl odebrán vzorek 8D; A. Legenda ke grafu je na Obrázku 16 (str. 67).



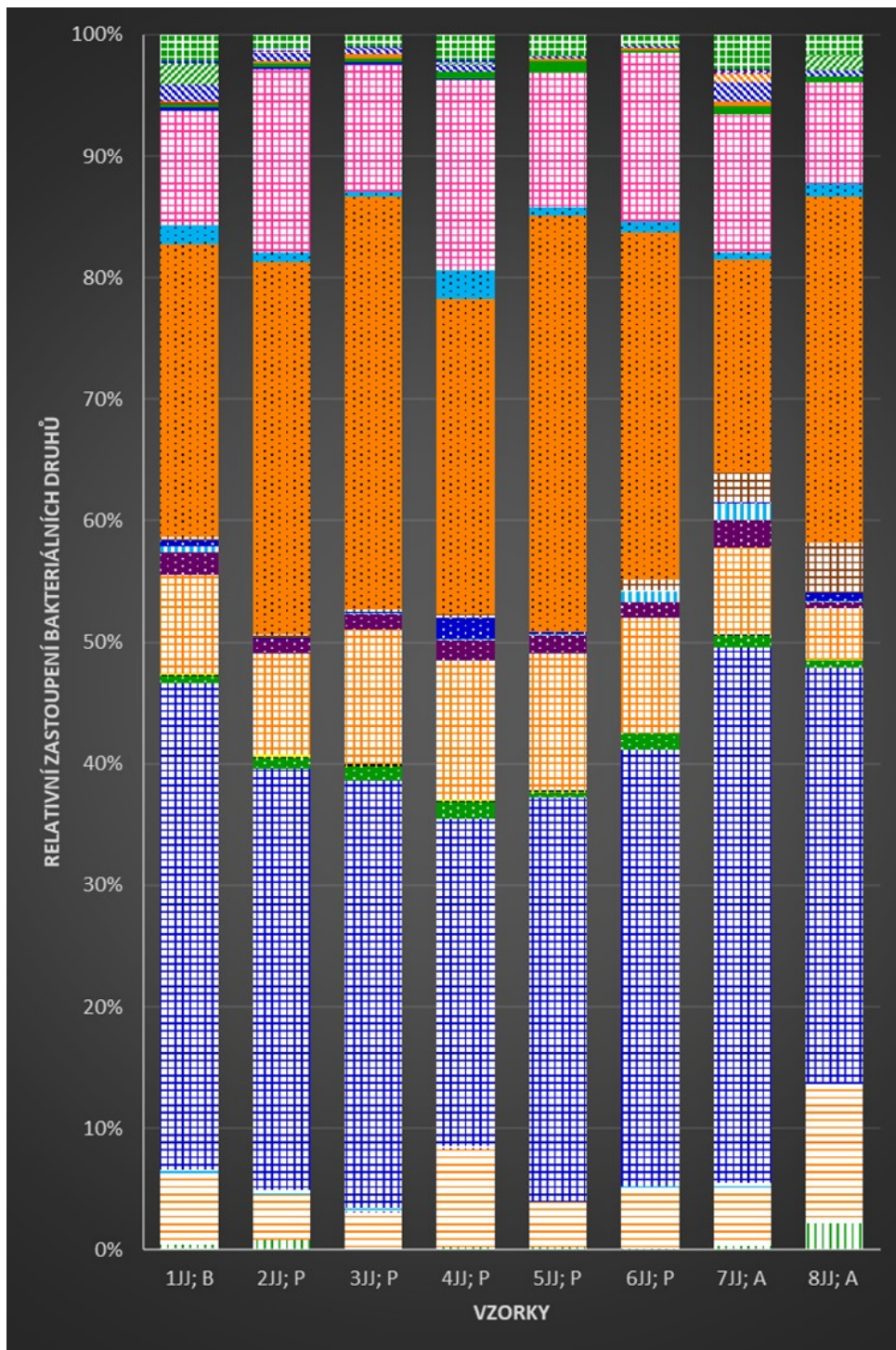
**Obrázek 8:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce DA. Graf dokumentuje změny relativního zastoupení bakteriálních druhů v odebraných vzorcích. Vzorky na ose x jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (P1 – před užitím KPP užívána jiná probiotika, P2 – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Dárce poskytl 2 vzorky před užitím KPP (1DA; P1 – 1 týden před KPP, 2DA; P1 – 1 den před KPP), důvodem je užívání jiných probiotik před začátkem tohoto experimentu. Vzorek 3DA; P2 byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 8DA; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a 10 dní po něm byl odebrán vzorek 9DA; A. Legenda ke grafu je na Obrázku 16 (str. 67).



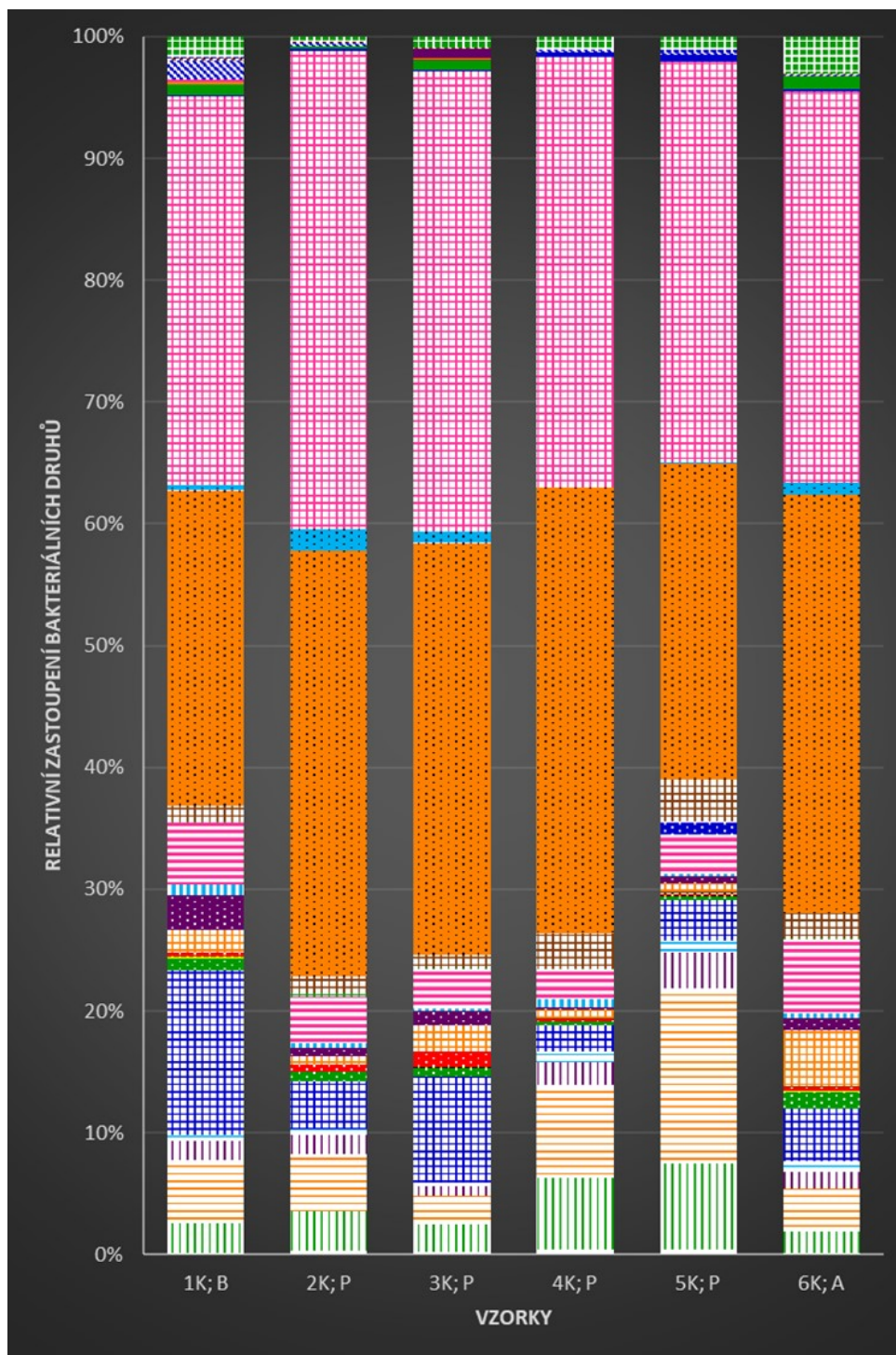
**Obrázek 9:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce DK. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose  $x$  jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2DK; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 7DK; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a 10 dní po něm byl odebrán vzorek 8DK; A. Legenda ke grafu je na Obrázku 16 (str. 67).



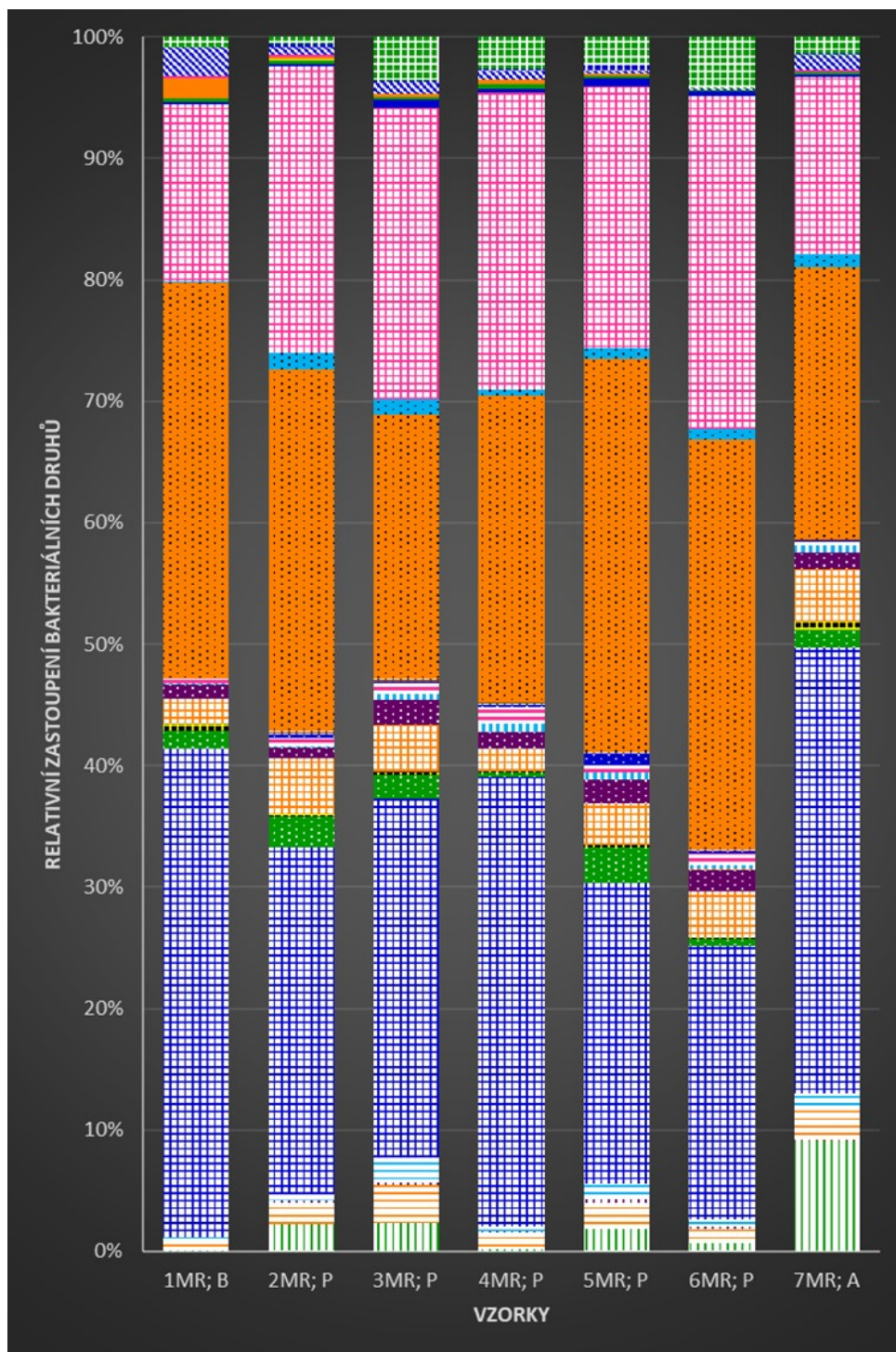
**Obrázek 10:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce EJ. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose x jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2EJ; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 7EJ; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a 10 dní po něm byl odebrán vzorek 8EJ; A. Legenda ke grafu je na Obrázku 16 (str. 67).



**Obrázek 11:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce JJ. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose x jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2JJ; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 7JJ; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a 10 dní po něm byl odebrán vzorek 8JJ; A. Legenda ke grafu je na Obrázku 16 (str. 67).

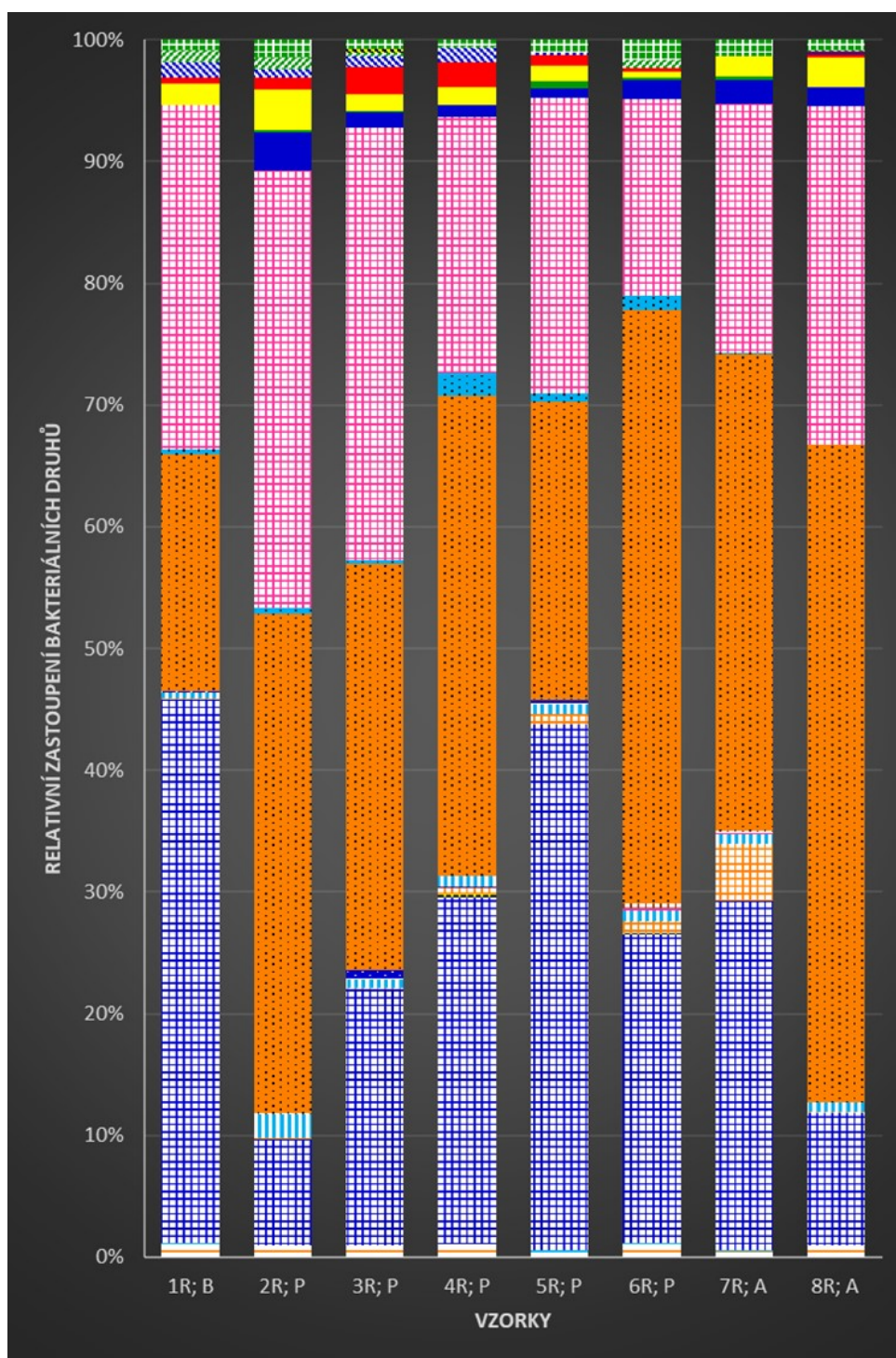


**Obrázek 12:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce K. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose x jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2K; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. dnu užívání KPP. Vzorek 6K; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a druhý vzorek po ukončení užívání KPP. Legenda ke grafu je na Obrázek 16 (str. 67).

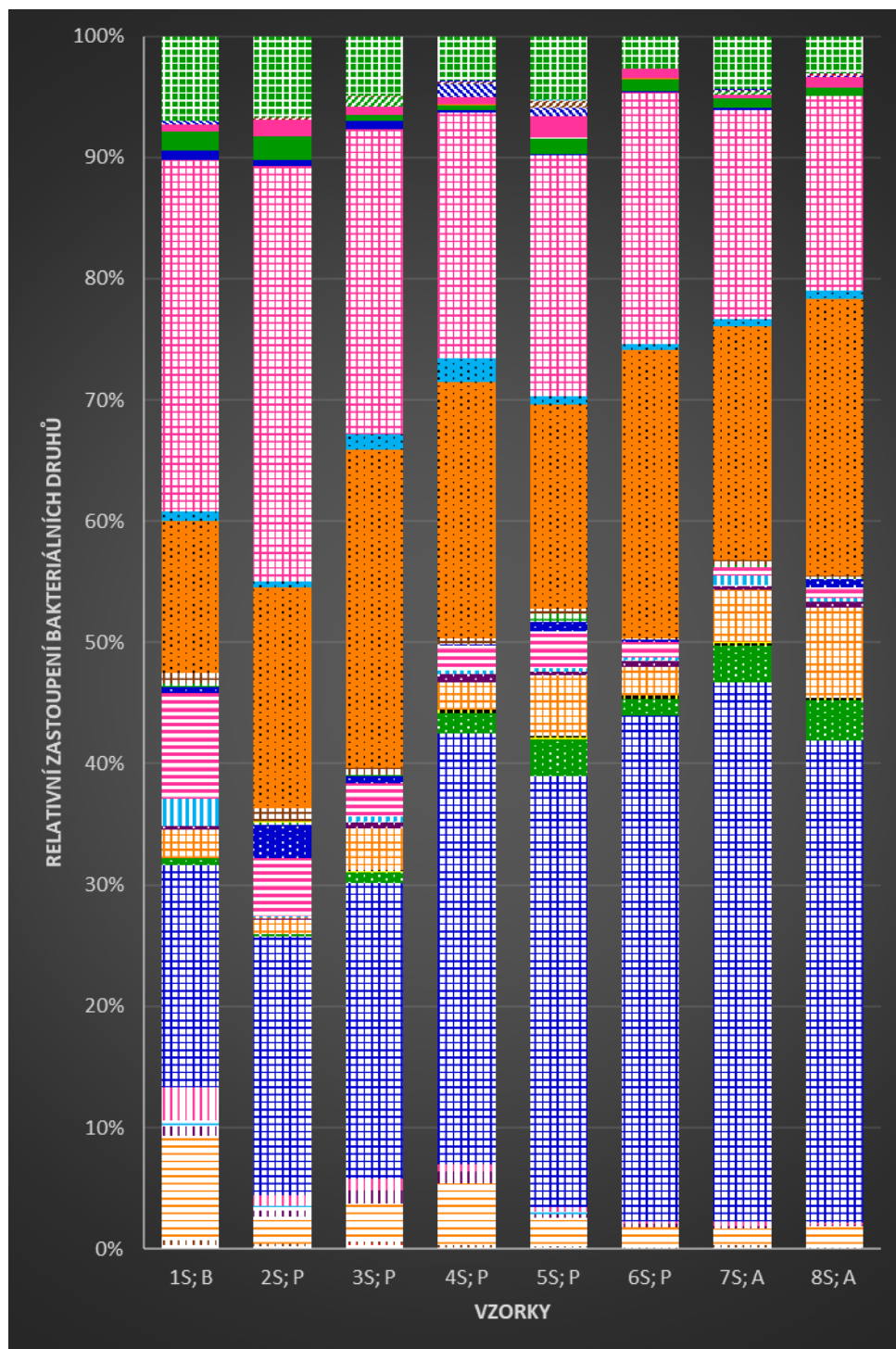


**Obrázek 13:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce MR. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose x jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2MR; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 7MR; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP. Dárce zapomněl odebrat poslední vzorek (8MR; A). Legenda ke grafu je na Obrázek 16 (str. 67).





**Obrázek 14:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce R. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose x jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2R; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 7R; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a 10 dní po něm byl odebrán vzorek 8R; A. Legenda ke grafu je na Obrázku 16 (str. 67).



**Obrázek 15:** Sloupcový graf reprezentující složení střevního mikrobiomu dárce S. Graf dokumentuje změny v relativním zastoupení bakteriálních druhů v odebraných fekálních vzorcích. Vzorky na ose *x* jsou označeny číslem vzorku dárce; dobou odběru fekálního vzorku (B – den před prvním užitím KPP, P – během užívání KPP, A – po ukončení užívání KPP). Vzorek 2S; P byl odebrán po 5 dnech užívání KPP, další vzorky byly odebrány v 12., 26., 40. a 61. dnu užívání KPP. Vzorek 7S; A byl odebrán 4. den po ukončení užívání KPP a 10 dní po něm byl odebrán vzorek 8S; A. Legenda ke grafu je na Obrázku 16 (str. 67).

	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales vadinBB60 group</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Defluviitaleaceae</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Corynebacteriaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacteriaceae</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Micrococcaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XI</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Propionibacteriales; Propionibacteriaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Atopobiaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriales Incertae Sedis</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>
	<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; "uncultured"</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>		<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>		<i>Bacteria; Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Muribaculaceae</i>		<i>Bacteria; Lentisphaerae; Lentisphaeria; Victivallales; Victivallaceae</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Beijerinckiaceae</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; "uncultured"</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Mitochondria</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae</i>
	<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>
	<i>Bacteria; Cyanobacteria; Melainabacteria; Gastranaerophilales; "gut metagenome"</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>
	<i>Bacteria; Cyanobacteria; Oxyphotobacteria; Chloroplast; "uncultured eukaryote"</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>
	<i>Bacteria; Epsilonbacteraeota; Campylobacteria; Campylobacteriales; Campylobacteraceae</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>		<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Family XI</i>		<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Izimaplasmatales; "gut metagenome"</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Aerococcaceae</i>		<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Izimaplasmatales; "uncultured organism"</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Carnobacteriaceae</i>		<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "gut metagenome"</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Enterococcaceae</i>		<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "uncultured bacterium"</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>		<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "uncultured bacterium adhufec202"</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>		<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "unidentified"</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>		<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>
	<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>		<i>"Unassigned"</i>

Obrázek 16: Společná legenda pro všechny sloupcové grafy na Obrázcích 7–15 (str. 58–66).

Z NGS získaných dat vyplývá, že nevyšší zastoupení ve všech fekálních vzorcích všech dárců mají bakterie z čeledi *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*. Zastoupení těchto tří bakteriálních čeledí a jejich změny v relativním zastoupení v průběhu experimentu a užívání KPP, je zpracováno do Tabulky 17 (str. 68–69). Z Tabulky 17 vyplývá, že ve většině případů užívané KPP na zastoupení těchto tří čeledí nemělo prakticky žádný vliv.

Tabulka 17: Relativní zastoupení nejpočetnějších bakteriálních čeledí ve fekálních vzorcích všech dárců

Dárce	Vzorek	<i>Bacteroidaceae</i> [%]	<i>Lachnospiraceae</i> [%]	<i>Ruminococcaceae</i> [%]
D	1D; B	29,92	21,69	16,67
	2D; P	2,06	36,02	25,11
	3D; P	7,49	30,85	22,88
	4D; P	8,25	33,64	24,44
	5D; P	11,81	30,34	13,39
	6D; P	12,12	34,69	19,15
	7D; A	8,98	23,05	19,66
	8D; A	28,08	28,59	15,79
DA	1DA; P1	30,96	28,10	21,26
	2DA; P1	16,04	36,89	21,72
	3DA; P2	30,11	18,97	22,31
	4DA; P2	23,09	31,14	23,75
	5DA; P2	17,35	21,08	25,33
	6DA; P2	9,91	34,19	34,37
	7DA; P2	24,16	16,18	27,62
	8DA; A	16,11	28,44	22,29
	9DA; A	22,15	32,31	24,12
DK	1DK; B	41,54	26,70	6,30
	2DK; P	26,48	28,88	6,45
	3DK; P	23,27	34,81	8,18
	4DK; P	42,49	25,63	12,72
	5DK; P	17,59	44,14	5,39
	6DK; P	22,68	37,59	5,50
	7DK; A	30,93	29,64	7,15
	8DK; A	8,36	53,53	13,94

Dárce	Vzorek	<i>Bacteroidaceae</i> [%]	<i>Lachnospiraceae</i> [%]	<i>Ruminococcaceae</i> [%]
EJ	1EJ; B	44,31	16,28	18,20
	2EJ; P	41,55	26,78	20,21
	3EJ; P	33,98	24,22	24,75
	4EJ; P	44,00	20,83	15,25
	5EJ; P	35,47	26,11	26,48
	6EJ; P	37,24	26,30	22,75
	7EJ; A	39,56	22,91	20,40
	8EJ; A	41,16	20,49	23,99
JJ	1JJ; B	40,07	24,06	9,37
	2JJ; P	34,69	30,73	15,07
	3JJ; P	35,14	33,99	10,46
	4JJ; P	26,91	25,96	15,60
	5JJ; P	33,30	34,20	11,04
	6JJ; P	35,91	28,53	13,84
	7JJ; A	44,04	17,54	11,32
	8JJ; A	34,26	28,51	8,31
K	1K; B	13,57	25,91	31,87
	2K; P	3,90	34,95	39,26
	3K; P	8,75	33,77	37,81
	4K; P	2,08	36,56	35,37
	5K; P	3,32	26,00	32,93
	6K; A	4,35	34,40	32,08
MR	1MR; B	40,28	32,57	14,57
	2MR; P	28,62	29,79	23,62
	3MR; P	29,62	21,78	24,07
	4MR; P	36,99	25,26	24,50
	5MR; P	24,77	32,38	21,58
	6MR; P	22,48	33,72	27,45
	7MR; A	36,80	22,43	14,57
R	1R; B	44,67	19,46	28,27
	2R; P	8,71	41,07	35,95
	3R; P	21,05	33,36	35,54
	4R; P	28,48	39,42	21,13
	5R; P	43,13	24,44	24,26
	6R; P	25,26	48,75	16,17
	7R; A	28,66	39,22	20,43
	8R; A	10,92	54,05	27,78
S	1S; B	18,37	12,52	28,92
	2S; P	21,32	18,18	34,23
	3S; P	24,38	26,29	25,13
	4S; P	35,56	21,15	20,28
	5S; P	35,55	16,81	19,86
	6S; P	41,68	23,72	20,83
	7S; A	44,45	19,22	17,24
	8S; A	39,68	22,80	16,03

**Poznámka:** Pokračování tabulky 17. Vzorek: číslo vzorku dárce; doba odběru vzorku (B/P1 – před užíváním KPP, P/P2 – během užívání KPP, A – po skončení užívání KPP). Dárce S prodělal karcinom kolorekta.

Užívané KPP obsahují ve zvýšené míře čeledi *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* a *Streptococcaceae*. Relativní zastoupení těchto tří čeledí bylo ve zkoumaných fekálních vzorcích relativně nízké. Detekované změny v relativním zastoupení zmíněných tří čeledí jsou uvedeny v Tabulce 18 (str. 70–71).

Tabulka 18: Relativní zastoupení bakteriálních čeledí přítomných v KPP a ve fekálních vzorcích dárců

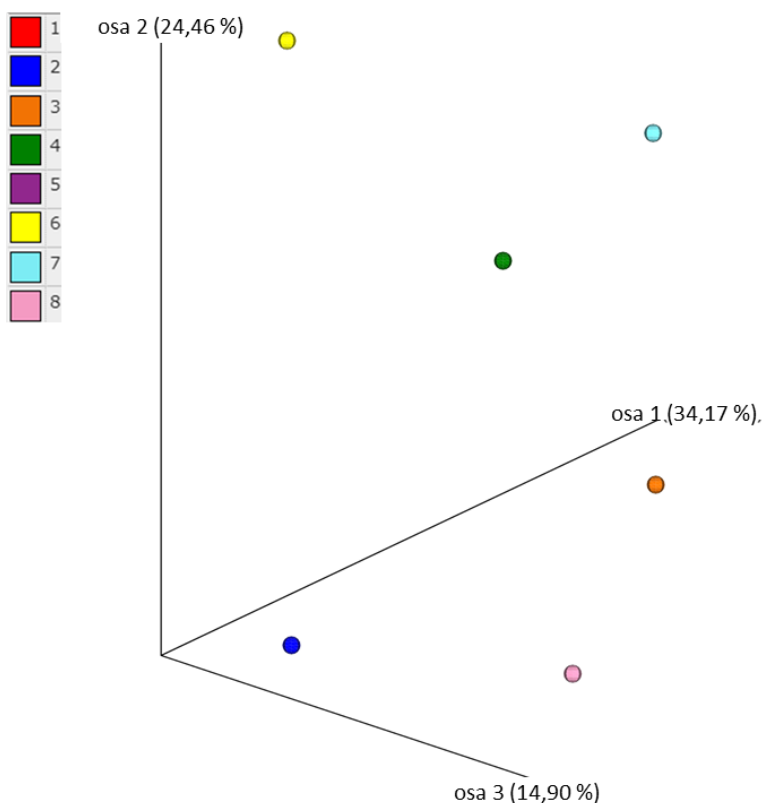
Dárce	Vzorek	<i>Bifidobacteriaceae</i> [%]	<i>Lactobacillaceae</i> [%]	<i>Streptococcaceae</i> [%]
D	1D; B	1,89	0,00	0,11
	2D; P	1,61	0,00	0,28
	3D; P	2,51	0,20	0,48
	4D; P	2,20	0,03	0,37
	5D; P	2,99	0,08	1,92
	6D; P	6,30	0,00	0,25
	7D; A	4,44	0,06	3,08
	8D; A	2,91	0,00	1,16
DA	1DA; P1	4,60	0,00	0,18
	2DA; P1	5,88	0,00	0,98
	3DA; P2	8,03	0,00	0,66
	4DA; P2	7,64	0,00	0,76
	5DA; P2	3,07	0,00	0,25
	6DA; P2	5,19	0,00	0,89
	7DA; P2	0,30	0,00	0,37
	8DA; A	0,16	0,00	0,27
	9DA; A	0,46	0,00	0,07
DK	1DK; B	4,12	0,00	0,42
	2DK; P	6,38	0,15	4,25
	3DK; P	13,48	0,00	1,48
	4DK; P	1,38	0,00	0,73
	5DK; P	10,49	0,00	1,68
	6DK; P	12,65	0,00	0,95
	7DK; A	6,37	0,00	1,80
	8DK; A	7,82	0,00	0,78
EJ	1EJ; B	0,97	0,00	0,00
	2EJ; P	1,72	0,00	0,09
	3EJ; P	8,70	0,00	0,07
	4EJ; P	1,28	0,00	0,09
	5EJ; P	3,83	0,00	0,00
	6EJ; P	2,19	0,00	0,00
	7EJ; A	2,55	0,00	0,00
	8EJ; A	2,59	0,00	0,00

Dárce	Vzorek	<i>Bifidobacteriaceae</i> [%]	<i>Lactobacillaceae</i> [%]	<i>Streptococcaceae</i> [%]
JJ	1JJ; B	0,33	0,00	0,47
	2JJ; P	0,77	0,00	0,04
	3JJ; P	0,08	0,00	0,07
	4JJ; P	0,23	0,00	0,15
	5JJ; P	0,23	0,00	0,06
	6JJ; P	0,14	0,00	0,92
	7JJ; A	0,25	0,00	1,35
	8JJ; A	2,10	0,00	0,13
K	1K; B	2,53	0,00	0,81
	2K; P	3,23	0,00	0,36
	3K; P	2,29	0,00	0,18
	4K; P	5,89	0,00	0,67
	5K; P	7,08	0,00	0,19
	6K; A	1,74	0,00	0,39
MR	1MR; B	0,11	0,00	0,13
	2MR; P	2,17	0,00	0,04
	3MR; P	2,32	0,00	0,53
	4MR; P	0,19	0,00	0,62
	5MR; P	1,76	0,02	0,62
	6MR; P	0,59	0,00	0,30
	7MR; A	9,05	0,00	0,59
R	1R; B	0,00	0,00	0,49
	2R; P	0,00	0,00	1,98
	3R; P	0,00	0,00	0,75
	4R; P	0,00	0,05	0,82
	5R; P	0,00	0,00	0,77
	6R; P	0,05	0,00	0,90
	7R; A	0,00	0,00	0,80
	8R; A	0,00	0,00	0,72
S	1S; B	0,00	0,00	2,25
	2S; P	0,00	0,00	0,14
	3S; P	0,00	0,00	0,47
	4S; P	0,00	0,00	0,30
	5S; P	0,00	0,00	0,27
	6S; P	0,00	0,00	0,23
	7S; A	0,00	0,05	0,80
	8S; A	0,00	0,00	0,30

**Poznámka:** Pokračování tabulky 18. Vzorek: číslo vzorku dárce; doba odběru vzorku (B/P1 – před užíváním KPP, P/P2 – během užívání KPP, A – po skončení užívání KPP). Dárce S prodělal karcinom kolorekta.

## 4.5 Vliv probiotik na biodiverzitu střevního mikrobiomu zkoumaný na základě metody NGS

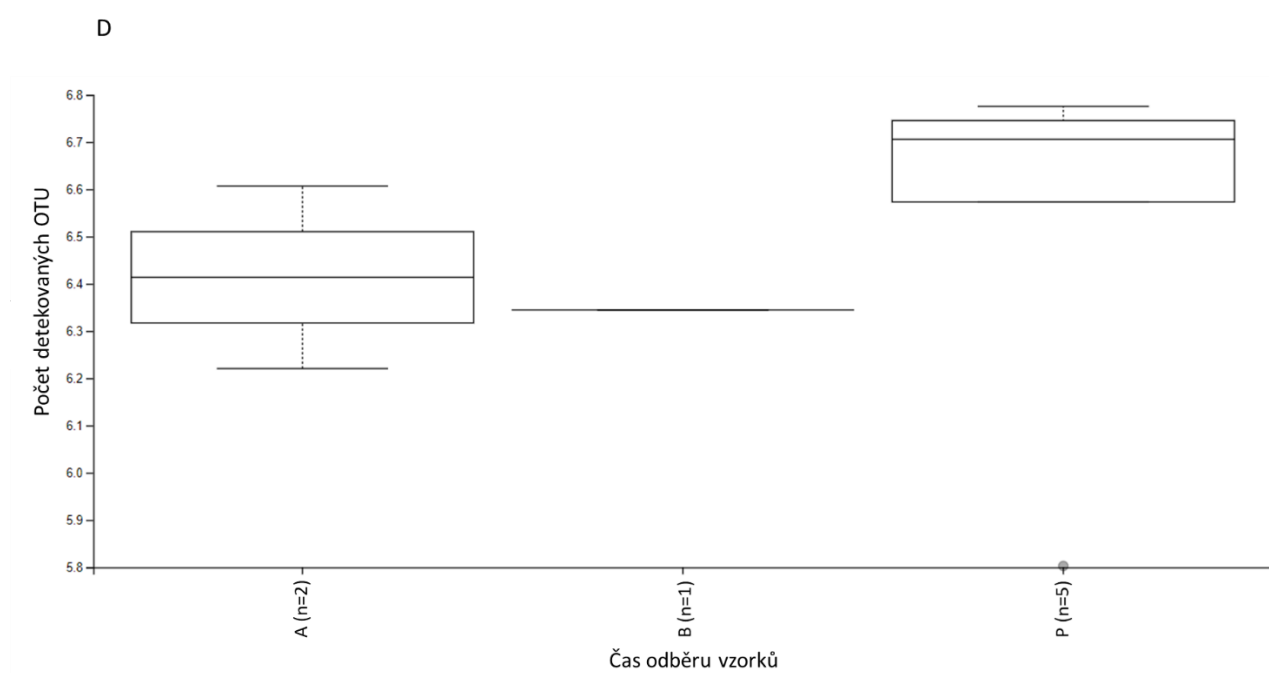
U všech fekálních vzorků byla provedena analýza hlavních koordinát (PCoA, z angl. „principal coordinate analysis“). Jedná se o vícerozměrnou statistickou metodu, která se používá při hodnocení biodiverzity vzorků v souboru. Tato metoda zkoumá pomocí asoiační matice podobnosti, respektive nepodobnosti, shody mezi jednotlivými vzorky. Výsledkem analýzy jsou prostorové diagramy. Podobné vzorky (označené barevnými body) jsou v diagramu shlukovány k sobě, vzorky, které se liší, jsou vzdálené. Analýza vzorků byla prováděna u každého dárce samostatně. Ukázka diagramu PCoA je na Obrázku 17. Zbylé diagramy jsou součástí Přílohy 2 (str. 115).



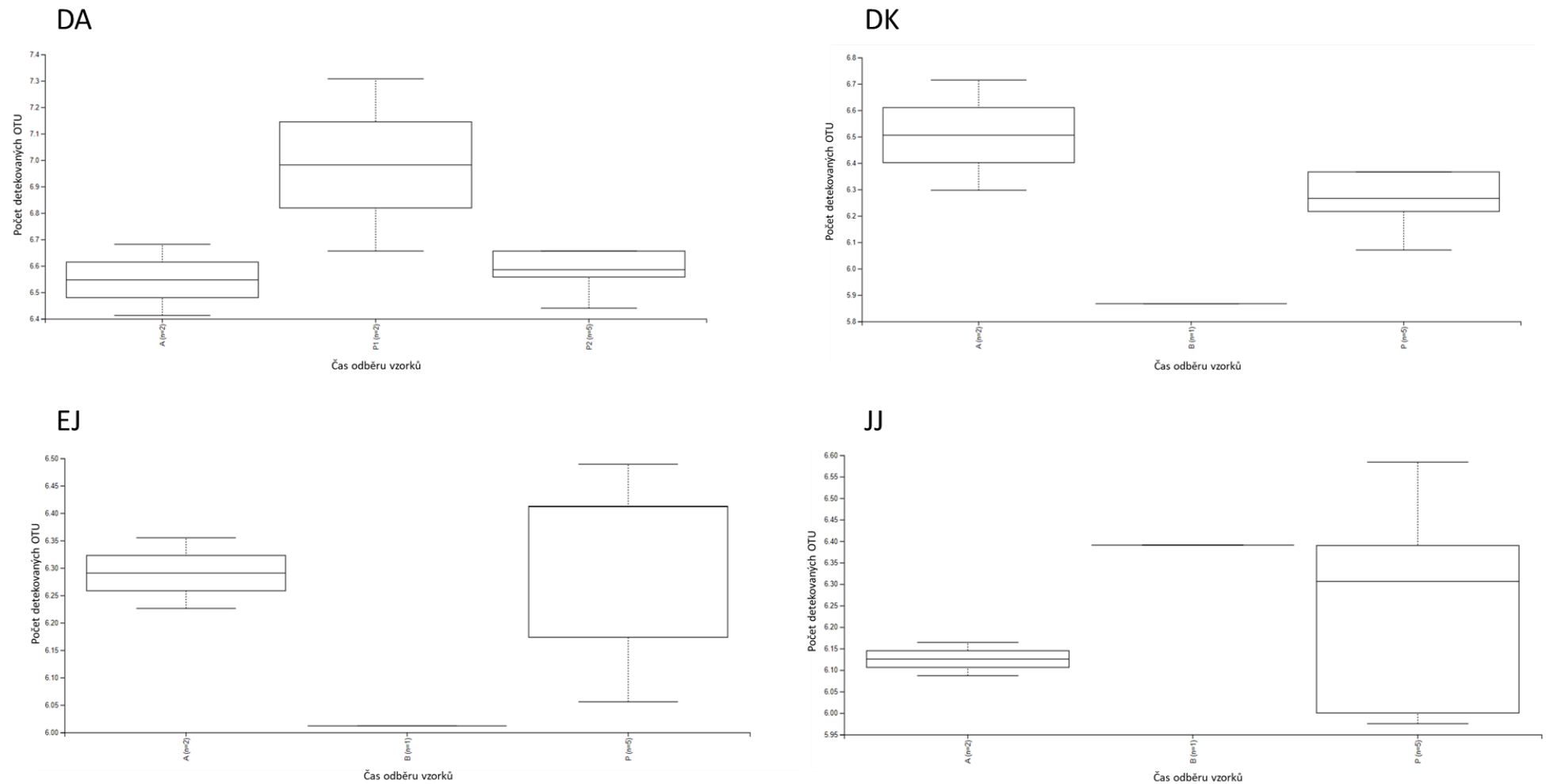
**Obrázek 17:** Příklad diagramu PCoA pro fekální vzorky poskytnuté od dárce R. Čísla u barevné legendy označují pořadí, ve kterém byly vzorky odebrány (1 – před užitím KPP, 2–6 – během užívání KPP, 7–8 – po ukončení užívání KPP). Vzhledem k dlouhým časovým intervalům mezi jednotlivými odběry vzorků jsou vzorky odlišné, a tudíž nedochází k shlukování bodů k sobě. Diagram by vše lépe ukázal, kdyby mohl být ve 3D prostoru. Osy diagramu nepředstavují žádný parametr, procenta v závorce představují pouze procenta variant v matici odlišnosti, resp. podobnosti.



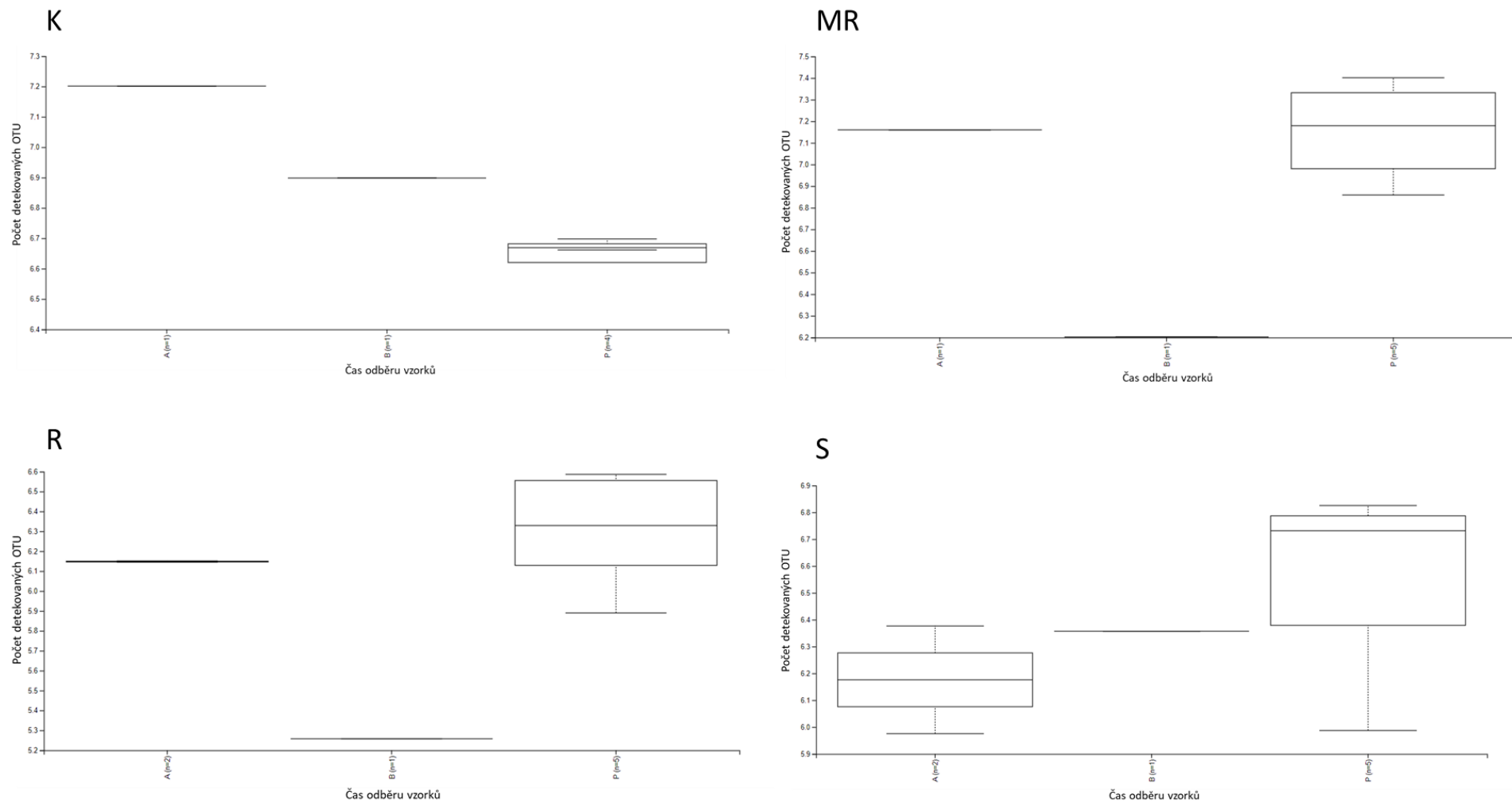
Pro grafické znázornění počtu operačních taxonomických jednotek (OTU, z angl. „operational taxonomic unit“) bylo využito krabicových grafů, též nazývaných „boxplot“. Jedná se o další typ zobrazení využívaný u statistických metod, který graficky znázorňuje a pomáhá porozumět rozmanitosti jednotlivých analyzovaných vzorků z velkého souboru dat. Počet OTU byl určen jednotlivě u každého dárce a skupiny vzorků. Kritériem pro bakteriální rozmanitost byla doba spojená s užitím KPP. U každého dárce byla biodiverzita bakteriálních druhů určována ve 3 skupinách vzorků (před užitím KPP, během užívání KPP a po ukončení užívání KPP). Na Obrázku 18 je ukázkový „boxplot“ znázorňující změnu v biodiverzitě bakteriálních druhů, která byla vyvolána užíváním KPP u dárce D. Tento graf vypovídá o nárstu počtu OTU u skupiny vzorků odebraných během užívání KPP oproti vzorku před užitím KPP. Po vysazení KPP došlo k postupnému návratu počtu OTU na původní hodnotu před užitím KPP. Zbylé grafy typu „boxplot“ znázorňující bakteriální biodiverzitu mezi skupinami vzorků jednotlivých dárců jsou na Obrázku 19 a 20 (str. 74 a 75).



**Obrázek 18:** Příklad „boxplotu“ vyjadřujícího biodiverzitu bakteriálních druhů mezi skupinami vzorků poskytnutých dárce D. Vzorky jsou rozděleny do skupin podle času odběru,  $n$  označuje počet vzorků ve skupině (A – po užití KPP, B – před užitím KPP, P – během užívání KPP). Diverzita bakteriálních druhů ve skupinách fekálních vzorků je počítána pomocí operačních taxonomických jednotek (OTU). Každý graf typu „boxplot“ obsahuje „boxy“ nebo čáry (v případě 1 vzorku ve skupině). „Box“ je vymezen dolním a horním kvartilem a uvnitř se nachází medián (střední hodnota rozmanitosti), úsečky vedoucí od hranice „boxu“ představují odlehle hodnoty.



**Obrázek 19:** Grafy typu „boxplot“ pro dárce DA, DK, EJ a JJ ukazující změny v biodiverzitě střevních bakteriálních druhů mezi skupinami vzorků na ose  $x$  (A – po užití KPP, B, P1 – před užitím KPP, P, P2 – během užívání KPP), počet vzorků ve skupině udává číslo  $n$ . Biodiverzita bakteriálních druhů ve skupinách fekálních vzorků je počítána pomocí operačních taxonomických jednotek (OTU). Skupiny vzorků jsou řazeny stejně jako na Obrázku 18 str. 73 (v pořadí: A, B, P).



**Obrázek 20:** Grafy typu „boxplot“ pro dárce K, MR, R a S ukazující změny v biodiverzitě střevních bakteriálních druhů mezi skupinami vzorků na ose  $x$  (A – po užití KPP, B – před užitím KPP, P – během užívání KPP), počet vzorků ve skupině udává číslo  $n$ . Biodiverzita bakteriálních druhů ve skupinách fekálních vzorků je počítána pomocí operačních taxonomických jednotek (OTU). Skupiny vzorků jsou řazeny stejně jako na Obrázku 18 str. 73 (v pořadí: A, B, P).

## 5 Diskuse

Celá studie byla inspirována snahou zjistit vliv kapalných KPP („Pro Alive“, „Activ Detox“ od firmy Ascended Health) na lidský mikrobiom. Jedná se o KPP, které zatím nejsou dostupné na českém trhu. Práce se zaměřuje především na biodiverzitu střevních bakteriálních druhů, zejména z pohledu jejího ovlivnění užíváním KPP. Pracovní hypotézou pro tuto pilotní studii bylo, že pokud dárce bude užívat KPP, vyvolá to změnu v biodiverzitě jeho střevního mikrobiomu.

Pro studium biodiverzity bakteriálních druhů bylo využito standartně používaných metod. V případě této pilotní studie byla biodiverzita určena pomocí dvou metod. Obě metody jsou založeny na izolaci bakteriální DNA kódující gen pro 16S rRNA z poskytnutých lidských fekálních vzorků a následné identifikaci bakterií.

První metoda bývá označována jako PCR-DGGE analýza [104]. Výhodou této metody je její časová nenáročnost a jednoduchost. Metoda je dále vhodná pro vytvoření prvotní představy o změnách v mikrobiomu. Zakládá se na amplifikaci izolované bakteriální DNA. Správná amplifikace byla ověřena kontrolní agarosovou elektroforézou. Příklad správné amplifikace je zobrazen na Obrázku 3 (str. 52), kde je vidět přítomnost požadované zóny o velikosti 200 bp. V případě, že by nedošlo k zobrazení této zóny na agarosovém gelu, znamenalo by to nedostatečnou amplifikaci požadovaného úseku nebo chybu v některém z předchozích kroků a bylo by potřeba přípravu vzorku opakovat od začátku. Se správně amplifikovanou DNA byla provedena DGGE elektroforéza. Na DGGE gelech byly sledovány změny v přítomnosti a intenzitě jednotlivých zón. Na základě pozorování byly vybrány významné zóny (intenzita, přítomnost u různých osob, vhodnost pro vyříznutí – dobře ohraničené atd.) a bakteriální DNA z těchto zón byla sekvenována pomocí Sangerova sekvenování. Vybrané zóny jsou označeny na Obrázku 5 (str. 55) písmeny A–N. Na DGGE gelech jsou patrné změny v zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů u všech vzorků. Metodou ovšem nelze určit větší množství přítomných bakteriálních druhů, tudíž neposkytuje podrobnější informace o biodiverzitě.

Proto byla použita druhá metoda, založená na přípravě DNA knihovny a následné sekvenaci označované jako NGS. Standardní postup této metody je popsán v práci autorů Fliegerová a kol. [111]. Sekvence byla provedena na platformě Ion Torrent. Výhodou tohoto přístupu je získání komplexních a podrobných informací o relativním zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů. Jak ukazují prezentovaná data, metoda je mnohem

citlivější než PCR-DGGE analýza. Značné množství komplexních dat je třeba zpracovat například v počítačovém programu QIIME 2, jak doporučuje Di Segni a kol. [115] ve své práci. Výstupem mohou být PCoA diagramy nebo grafy typu „boxplot“ zobrazující informace o biodiverzitě.

V této pilotní studii bylo zkoumáno, zda užití KPP v průběhu 9 týdnů ovlivní biodiverzitu střevního mikrobiomu. Po provedení statistického vyhodnocení, založeného na grafickém znázornění počtu OTU, byl u 6 z 9 dárců nalezen trend zvýšení biodiverzity po dobu užívání KPP. Například z grafu na Obrázku 18 (str. 73) je zřejmé, že užíváním KPP se zvýšila biodiverzita přítomných bakteriálních druhů (narostl počet OTU), medián dosahuje hodnoty cca 6,7 OTU, což je přibližně o 0,35 OTU víc než u vzorku odebraného před užitím KPP. Tento trend nárůstu počtu OTU spojený s užíváním KPP byl též pozorován Kimem a kol. [116]. Vzorky odebrané po skončení užívání KPP vykazují OTU přibližně 6,4. Tato hodnota se blíží hodnotě před zahájením užívání KPP. Po ukončení užívání KPP došlo u všech těchto 6 dárců k poklesu biodiverzity zpět směrem k hodnotě před užitím KPP, i když u 5 z 6 dárců je rozdíl mezi hodnotami OTU u vzorku před užitím a po ukončení užívání KPP markantnější. Dá se tedy předpokládat, že v krátkém čase dojde k návratu na původní hladinu. Tento fakt potvrzuje celá řada studií. Už dříve bylo zjištěno, že většina probiotických bakterií dlouhodobě nekolonizuje a ani se neusazuje jako součást rezidentní mikrobioty v prostředí střev [117]. Vzhledem ke zvýšenému počtu OTU po užití KPP lze říct, že KPP má pozitivní vliv na biodiverzitu střevního mikrobiomu. Obecně platí pravidlo, čím vyšší je biodiverzita střevního mikrobiomu, tím vyšší je prospěšnost pro zdravotní stav hostitele. Hlavním předpokladem ovšem je, že se nejedná o vysokou rozmanitost patogenních bakteriálních druhů v hostitelském mikrobiomu [50].

Překvapivé výsledky byly zjištěny u dárců DA, JJ a K. Po statistickém vyhodnocení bylo zjištěno u všech tří dárců snížení počtu OTU, tedy biodiverzity střevních bakterií, ve vzorcích odebíraných během užívání KPP oproti vzorku odebranému před zahájením užívání KPP. Důvodem těchto odchylek od očekávaného trendu může být nějaký neodhalený klinický problém u těchto dárců nebo neúčinnost tohoto KPP na střevní mikrobiom u zmíněných jedinců. To je v souladu se závěry článku autora Islam [79], kde je popsáno, že probiotika mohou mít na každého uživatele jiný vliv. U dárce DA může mít zásadní vliv i dlouhodobé užívání jiných probiotik před zahájením celé studie.

Okrajově byl pro určení biodiverzity využit časově náročnější postup separace bakteriální DNA na elektroforetickém gelu a sekvenování dříve často využívanou Sangerovou metodou. Tento postup vedl k identifikaci několika bakteriálních druhů, které jsou typické pro lidskou střevní mikroflóru. U všech dárců se podařilo do určité míry nezávisle na užití KPP identifikovat druhy *Roseburia hominis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium rectale* a *Gemmiger formicilis*. Pouze u dárce DK se nepodařilo identifikovat bakterie *Eubacterium rectale*, *Gemmiger formicilis*. Ovšem podle výsledků NGS jsou i u tohoto dárce přítomny čeledi, do nichž patří tyto dva druhy, zřejmě ale s nízkou početností. Z identifikované pětičlady bakteriálních druhů jsou *Roseburia hominis* a *Faecalibacterium prausnitzii* butyrát produkující bakterie nacházející se běžně v GIT lidí [118]. Další hojně se vyskytující střevní bakterií u zdravých jedinců je druh *Ruminococcus bromii*. Tento druh je zástupce čeledi *Ruminococcaceae*, která tvoří okolo 20 % mikroflóry zdravého lidského tlustého střeva [119]. *Ruminococcus bromii* je speciální bakterie využívající škrob [120]. *Eubacterium rectale* je významným druhem podporujícím střevní homeostázu. Množství tohoto druhu je sníženo u pacientů se zánětlivými onemocněními střev (např. karcinom tlustého střeva) [121] a naopak je poměrně vysoké u lidí se zdravým intestinálním traktem [122]. Tento fakt dokládá také Obrázek 5 (str. 55), z něhož je vidět málo intenzivní zónu odpovídající druhu *Eubacterium rectale* u dárce S, který prodělal karcinom tlustého střeva. Další běžně se vyskytující střevní bakterií je *Gemmiger formicilis*. Zastoupení tohoto druhu klesá například u pacientů s Crohnovou chorobou [123].

U několika dárců se podařilo identifikovat i méně běžnou bakterii pro střevní mikrobiom. Jedná se o druh *Haemophilus parainfluenzae*, který je typický spíše pro mikroflóru v ústech a horních cestách dýchacích. Tento druh je považován za patogenní a často bývá spojován s bronchitidou, otitidou, endokarditidou a pneumonií [124]. Přítomnost rodu *Haemophilus* ve fekálních vzorcích potvrdila i prováděná metoda NGS.

Vedle zkoumání vlivu KPP na biodiverzitu střevního mikrobiomu bylo předmětem studie i určení relativního zastoupení jednotlivých bakteriálních čeledí. Podrobná data o zastoupení bakteriálních čeledí ve střevním mikrobiomu jednotlivých dárců znázorňují sloupcové grafy na Obrázcích 7–15 (str. 58–66). Analýzy ukázaly, že relativní zastoupení čeledí *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* zůstává prakticky neměnné a užívání KPP nemá na relativní zastoupení těchto tří čeledí téměř žádný vliv. Vysoké relativní zastoupení těchto tří čeledí v lidských fekálních vzorcích potvrzuje i studie autorů Biagi a kol. [125], která kromě vysokého zastoupení těchto čeledí ukázala, že množství

bakterií z čeledí *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* klesá s věkem člověka. Můžeme předpokládat, že při působení KPP je zvýšená biodiverzita střevních bakterií způsobena změnami v relativním zastoupení méně početných bakteriálních čeledí. Tato myšlenka je ve shodě s výsledky studie autorů Kim a kol. [116].

Při zjišťování relativního zastoupení jednotlivých bakteriálních čeledí v mikrobiomu dárců se nabízí otázka, zda se v odebraných fekálních vzorcích podaří identifikovat i bakteriální čeledi obsažené v KPP. Hlavní složkou užívaných KPP byly bakteriální čeledi *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*. Ne vždy se ale podařilo ve vzorcích odebraných během užívání a po užití KPP identifikovat všechny tři čeledi. Zejména čeleď *Lactobacillaceae* byla identifikována jen v malém množství vzorků. Důvodem by mohla být interakce s jinými druhy bakterií přítomnými ve střevním mikrobiomu a následná lýze dodávaných čeledí. Suplementované bakterie také nemusí mít schopnost zachytit se v prostředí střeva a kolonizovat jej. Toto potvrzuje studie autorů Guarner a kol. [117]. Dalším důvodem negativního záchytu by mohlo být nízké zastoupení oproti jiným čeledím, pak by se hledaná čeleď jevila jako relativně nepřítomná. Vzhledem k tomu, že střevní mikroflóra obsahuje obrovské množství bakteriálních druhů, nelze za použití dostupných technik identifikovat všechny přítomné bakteriální druhy. Běžně se udává, že střevní mikroflóru tvoří několik tisíc bakteriálních druhů [14].

Další otázkou bylo, do jaké míry jsou si podobné vzorky získané od jednoho dárce. Pro její zodpovězení byla zkoumána  $\beta$ -diverzita fekálních vzorků pomocí metody PCoA [126]. Podobnosti mezi vzorky byly vyhodnocovány na základě počtu OTU. Hledání podobností mezi vzorky jednoho dárce se ukázalo v případě této pilotní studie jako nevhodné. Jednotlivé vzorky poskytnuté jedním dárce mezi sebou nevykazovaly podobnost na základě počtu OTU. Přiložené diagramy neshlukují objekty do jednoho místa, tedy jednotlivé vzorky jsou odlišné z hlediska počtu OTU. Tato metoda by měla význam v případě, že by bylo prováděno sledování podobnosti, respektive nepodobnosti na větším souboru vzorků (např. větší počet vzorků odebíraných v intervalech jednoho dne). Takto získané výsledky by měly určitě daleko větší vypovídající hodnotu.

Na základě dat z NGS byly všechny vzorky podrobně analyzovány a porovnány mezi sebou. Obecně je známo, že na složení střevního mikrobiomu člověka má zásadní vliv celá řada vnějších a vnitřních faktorů [19]. Těmito faktory jsou například věk, váha, pohlaví, strava, zdravotní stav, užívané léky, styl života, okolní prostředí pro život, stres a mnoho

dalších faktorů [21,22]. Kvůli této skutečnosti je potřeba ke každému dárci přistupovat individuálně a sledovat jeho střevní mikrobiom samostatně. I když všichni dárci užívali stejné KPP, jejichž vliv na střevní mikrobiom byl zkoumán, jednalo se pouze o jeden z mnoha ovlivňujících faktorů. U jednotlivých dárců bylo pozorováno mnoho změn v relativním zastoupení jednotlivých bakteriálních čeledí, a proto nelze všechny zmínit. V následujících odstavcích je popsáno pouze několik vybraných příkladů.

Vliv vnějších a vnitřních faktorů na složení střevního mikrobiomu byl pozorován u dárkyní JJ a DK. Zmíněné dárkyně jsou monozygotní dvojčata, jsou tedy geneticky shodné. V raném věku byly obě dárkyně vystaveny společným zdrojům (těmi mohly být – strava, společné prostředí pro život, další sourozenec, domácí mazlíček [24]) a u obou by měl být pozorován vliv stejné genetické predispozice [36]. Dalo by se očekávat, že střevní mikrobiom obou dárkyň by měl být do jisté míry podobný. Ovšem prezentované výsledky odhalily odlišnosti. Nepodobnost je zřejmě způsobena silnějším účinkem odlišného prostředí [14], ve kterém obě dárkyně nyní žijí, rozdílností ve stravovacích návycích (DK – běžná strava, JJ – paleo dieta), vliv může mít i těhotenství dárkyně DK, což naznačuje například studie autorů Ferrocino a kol. [127].

Dalším příkladem je dárkyně S, která v minulosti podstoupila úspěšnou léčbu kolorektálního karcinomu. Před užitím KPP u ní bylo zjištěno zvýšené relativní zastoupení bakteriálních druhů z čeledi *Streptococcaceae*. Při užívání a po ukončení užívání KPP bylo u této dárkyně naměřeno až o řád nižší relativní zastoupení bakterií z této čeledi. Čeleď *Streptococcaeae* vedle „prospěšných“ bakterií obsažených v KPP zahrnuje mnoho druhů bakterií, které působí jako patogeny. Například u lidí s karcinomem bylo detekováno zvýšené množství *Streptococcus bovis* [128,129]. Zvýšené zastoupení rodu *Streptococcus* bylo pozorováno i u pacientů s léčeným karcinomem [130]. V případě této dárkyně by se dalo užívání KPP považovat za prospěšné, i přestože je při pohledu na graf na Obrázku 20 (str. 75) vidět snížený počet OTU po skončení užívání KPP oproti stavu před užitím KPP. Snížení počtu OTU po ukončení užívání KPP by mohlo znamenat účinek „prospěšných“ bakterií obsažených v KPP na patogenní bakteriální druhy přítomné v mikrobiomu v důsledku problémů spojených s dříve se vyskytujícím karcinomem.

Získané výsledky z této pilotní studie nejsou zcela jednoznačné, proto bude třeba užívání těchto KPP podrobit dalšímu zkoumání. Studie naznačila mnoho otázek, pro jejichž zodpovězení bude potřeba provést experimenty s více dárci. Důležité bude získat dárc



různých věkových skupin, podobných i odlišných návyků (např. strava, zdravotní stav, sportovní aktivita, prostředí pro život, příbuzenský vztah) a zvýšit počet vzorků od každého subjektu.

Závěrem je možné konstatovat, že i přes malý počet zkoumaných subjektů a analyzovaných vzorků byla tato pilotní studie úspěšná. Byl prokázán pozitivní vliv KPP na střevní mikrobiom uživatelů, protože u většiny dárců po podání KPP vzrostla biodiverzita střevních bakteriálních druhů. Tento nárůst ovšem není trvalý. Pro dosažení dlouhodobého stavu zvýšené biodiverzity, by bylo zřejmě potřeba užívat KPP bez přerušení, jak nasvědčují výsledky spojené s užíváním KPP a nárustem biodiverzity v tomto období. Probiotické mikroorganismy střevo nekolonizují, proto je potřeba KPP podávat trvale [44].

## 6 Souhrn

Předkládané pilotní studie se účastnilo 9 dárců. Smyslem celé studie bylo zjistit, zda užívání KPP změní biodiverzitu střevních bakteriálních druhů. Pro práci byly užity standardně používané metody pro identifikaci bakterií a sledování biodiverzity přítomných bakteriálních druhů.

- Pomocí analýzy PCR-DGGE byla na elektroforetickém gelu sledována biodiverzita střevních bakterií. Metoda je založena na dělení bakteriální DNA kódující gen pro 16S rRNA. Pomocí Sangerova sekvenování byly identifikovány některé bakteriální druhy (*Roseburia hominis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium rectale*, *Gemmiger formicilis*) typické pro „zdravý“ střevní mikrobiom.
- Za pomoci NGS metody a následného statistického zpracování získaných dat byla ve většině případů zjištěna změna biodiverzity střevních bakteriálních druhů při užívání KPP. Dále metoda poskytla podrobnější přehled o složení střevního mikrobiomu jednotlivých dárců.
- Bylo zjištěno, že užívání KPP nemá žádný významný vliv na relativní zastoupení početnějších bakteriálních čeledí.
- Ve vzorcích odebraných během užívání a po ukončení užívání KPP se nepodařilo identifikovat vyšší relativní zastoupení „prospěšných“ bakteriálních čeledí obsažených v užívaných KPP oproti vzorkům odebraným před užitím.

## Seznam literatury

1. Hillman, E.T., Lu, H., Yao, T., Nakatsu, C.H.: Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ.* **32**, 300–313 (2017).
2. Simon, G.L., Gorbach, S.L.: Intestinal microflora. *Med. Clin. North Am.* **66**, 557–74 (1982).
3. Berg, R.D.: The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**, 430–35 (1996).
4. Guarner, F., Malagelada, J.-R.: Gut flora in health and disease. *Lancet.* **361**, 512–19 (2003).
5. Bik, E.M.: Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr. Rev.* **67**, S164–71 (2009).
6. Avila, M., Ojcius, D.M., Yilmaz, O.: The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* **28**, 405–11 (2009).
7. Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., Dewhirst, F.E.: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–32 (2005).
8. Levy, R., Borenstein, E.: Metabolic modeling of species interaction in the human microbiome elucidates community-level assembly rules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12804–9 (2013).
9. Hunt, R.H., Camilleri, M., Crowe, S.E., El-Omar, E.M., Fox, J.G., Kuipers, E.J., Malfertheiner, P., McColl, K.E.L., Pritchard, D.M., Rugge, M., Sonnenberg, A., Sugano, K., Tack, J.: The stomach in health and disease. *Gut.* **64**, 1650–68 (2015).
10. Bik, E.M., Eckburg, P.B., Gill, S.R., Nelson, K.E., Purdom, E.A., Francois, F., Perez-Perez, G., Blaser, M.J., Relman, D.A.: Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 732–37 (2006).
11. Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyren, P., Engstrand, L.: Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS One.* **3**, e2836 (2008).

12. Ahmed, S., Macfarlane, G.T., Fite, A., McBain, A.J., Gilbert, P., Macfarlane, S.: Mucosa-Associated Bacterial Diversity in Relation to Human Terminal Ileum and Colonic Biopsy Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7435–42 (2007).
13. Leimena, M.M., Ramiro-Garcia, J., Davids, M., van den Bogert, B., Smidt, H., Smid, E.J., Boekhorst, J., Zoetendal, E.G., Schaap, P.J., Kleerebezem, M.: A comprehensive metatranscriptome analysis pipeline and its validation using human small intestine microbiota datasets. *BMC Genomics.* **14**, 530 (2013).
14. Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Fu, J., Zhernakova, A.: Host Genetics and Gut Microbiome: Challenges and Perspectives. *Trends Immunol.* **38**, 633–47 (2017).
15. Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B.: Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859–904 (2010).
16. Cresci, G.A., Bawden, E.: The Gut Microbiome: What we do and don't know. *Nutr. Clin. Pract.* **30**, 734–46 (2015).
17. Cho, I., Blaser, M.J.: The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 260–70 (2012).
18. Kroemer, G., Zitvogel, L.: The breakthrough of the microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 87–88 (2018).
19. Kumbhare, S.V., Patangia, D.V.V., Patil, R.H., Shouche, Y.S., Patil, N.P.: Factors influencing the gut microbiome in children: from infancy to childhood. *J. Biosci.* **44**, 49 (2019).
20. Blaser, M.J.: Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science.* **352**, 544–45 (2016).
21. Simpson, H.L., Campbell, B.J.: Review article: dietary fibre–microbiota interactions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **42**, 158–79 (2015).
22. Sakkas, H., Bozidis, P., Touzios, C., Kolios, D., Athanasiou, G., Athanasopoulou, E., Gerou, I., Gartzonika, C.: Nutritional Status and the Influence of the Vegan Diet on the Gut Microbiota and Human Health. *Medicina.* **56**, 88 (2020).

23. Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E.: Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 8–12 (2009).
24. Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., Knol, J.: Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One*. **11**, e0158498 (2016).
25. Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R.: Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11971–75 (2010).
26. Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., Heath, A.C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J.G., Lozupone, C.A., Lauber, C., Clemente, J.C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J.I.: Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. **486**, 222–27 (2012).
27. Agans, R., Rigsbee, L., Kenche, H., Michail, S., Khamis, H.J., Paliy, O.: Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 404–12 (2011).
28. Ringel-Kulka, T., Cheng, J., Ringel, Y., Salojärvi, J., Carroll, I., Palva, A., de Vos, W.M., Satokari, R.: Intestinal Microbiota in Healthy U.S. Young Children and Adults – A High Throughput Microarray Analysis. *PLoS One* **8**, e64315 (2013).
29. Sherman, M.P., Zaghoulani, H., Niklas, V.: Gut microbiota, the immune system, and diet influence the neonatal gut-brain axis. *Pediatr. Res.* **77**, 127–35 (2015).
30. Groer, M.W., Luciano, A.A., Dishaw, L.J., Ashmeade, T.L., Miller, E., Gilbert, J.A.: Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome*. **2**, 38 (2014).
31. Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Nageshwar Reddy, D.: Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21**, 8787–8803 (2015).

32. Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Parkhill, J., Flint, H.J.: Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* **5**, 220–30 (2011).
33. David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J.: Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* **505**, 559–63 (2014).
34. De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P.: Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14691–96 (2010).
35. Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* **444**, 1022–23 (2006).
36. Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, 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.: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* **457**, 480–84 (2009).
37. Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., Relman, D.A.: The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol.* **6**, e280 (2008).
38. Wilcox, M.H.: Gastrointestinal disorders and the critically ill. Clostridium difficile infection and pseudomembranous colitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**, 475–93 (2003).
39. Beaugerie, L., Petit, J.-C.: Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 337–52 (2004).
40. Marra, F., Lynd, L., Coombes, M., Richardson, K., Legal, M., Fitzgerald, J.M., Marra, C.A.: Does antibiotic exposure during infancy lead to development of asthma?: a systematic review and metaanalysis. *Chest.* **129**, 610–18 (2006).

41. Prioult, G., Nagler-Anderson, C.: Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol. Rev.* **206**, 204–18 (2005).
42. Löfmark, S., Jernberg, C., Jansson, J.K., Edlund, C.: Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 1160–67 (2006).
43. Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., Jansson, J.K.: Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* **1**, 56–66 (2007).
44. Společnost pro probiotika a prebiotika. [online] Dostupné z URL: <<https://www.probiotika-prebiotika.cz/>> [cit. 27. 3. 2021].
45. Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R.: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13780–85 (2007).
46. Bowler, P.G., Duerden, B.I., Armstrong, D.G.: Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 244–69 (2001).
47. Evaldson, G., Heimdahl, A., Kager, L., Nord, C.E.: The normal human anaerobic microflora. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **35**, 9–15 (1982).
48. Hollister, E.B., Gao, C., Versalovic, J.: Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. *Gastroenterology.* **146**, 1449–58 (2014).
49. 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., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., et al.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* **473**, 174–80 (2011).
50. Yin, L., Wan, Y.-D., Pan, X.-T., Zhou, C.-Y., Lin, N., Ma, C.-T., Yao, J., Su, Z., Wan, C., Yu, Y.-W., Zhu, R.-X.: Association Between Gut Bacterial Diversity and Mortality in Septic Shock Patients: A Cohort Study. *Med. Sci. Monit.* **25**, 7376–82 (2019).

51. den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M.: The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* **54**, 2325–40 (2013).
52. Macfarlane, S., Macfarlane, G.T.: Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 67–72 (2003).
53. Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Backhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M., Gordon, J.I.: Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16767–72 (2008).
54. Butyrate production from lactate by human colonic microflora: *Reproduction Nutrition Development*. [online] Dostupné z URL: <<https://rnd.edpsciences.org/component/solr/?task=results#!q=%2BButyrate%2Bproduction%2Bfrom%2Blactate%2Bby%2Bhuman%2Bcolonic%2Bmicroflora&sort=relevance&rows=10>> [cit. 11. 4. 2021].
55. Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., Gordon, J.I.: Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. **291**, 881–84 (2001).
56. De Biase, D., Pennacchietti, E.: Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the gadBC operon. *Mol. Microbiol.* **86**, 770–86 (2012).
57. Thomas, C.M., Hong, T., van Pijkeren, J.P., Hemarajata, P., Trinh, D.V., Hu, W., Britton, R.A., Kalkum, M., Versalovic, J.: Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One*. **7**, e31951 (2012).
58. Hill, M.J.: Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **6**, S43–45 (1997).
59. Baddini Feitoza, A., Fernandes Pereira, A., Ferreira da Costa, N., Gonçalves Ribeiro, B.: Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. *Nutr. Hosp.* **24**, 422–28 (2009).



60. Velagapudi, V.R., Hezaveh, R., Reigstad, C.S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., Islam, S., Felin, J., Perkins, R., Borén, J., Oresic, M., Bäckhed, F.: The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J. Lipid Res.* **51**, 1101–12 (2010).
61. Fang, Y., Cao, W., Xia, M., Pan, S., Xu, X.: Study of Structure and Permeability Relationship of Flavonoids in Caco-2 Cells. *Nutrients.* **9**, 1301 (2017).
62. Marín, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F.: Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 905215 (2015).
63. Clayton, T.A., Baker, D., Lindon, J.C., Everett, J.R., Nicholson, J.K.: Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14728–33 (2009).
64. Wallace, B.D., Wang, H., Lane, K.T., Scott, J.E., Orans, J., Koo, J.S., Venkatesh, M., Jobin, C., Yeh, L.-A., Mani, S., Redinbo, M.R.: Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science.* **330**, 831–35 (2010).
65. Wilson, I.D., Nicholson, J.K.: Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* **179**, 204–22 (2017).
66. Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C.: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15064–69 (2008).
67. Cash, H.L., Whitham, C.V., Behrendt, C.L., Hooper, L.V.: Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science.* **313**, 1126–30 (2006).
68. Bescucci, D.M., Clarke, S.T., Brown, C.L.J., Boras, V.F., Montana, T., Uwiera, R.R.E., Inglis, G.D.: The absence of murine cathelicidin-related antimicrobial peptide impacts host responses enhancing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Gut Pathog.* **12**, 53 (2020).
69. López-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Hooper, L.V., Gordon, J.I., Hultgren, S.J., Parks, W.C.: Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **148**, 1305–15 (2000).

70. Alakomi, H.L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I.M.: Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2001–5 (2000).
71. Cario, E., Gerken, G., Podolsky, D.K.: Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology.* **132**, 1359–74 (2007).
72. Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Washington, M.K., Shi, Y., Liu, L., Chaturvedi, R., Peek, R.M., Wilson, K.T., Polk, D.B.: Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* **121**, 2242–53 (2011).
73. Ito, T., Sekizuka, T., Kishi, N., Yamashita, A., Kuroda, M.: Conventional culture methods with commercially available media unveil the presence of novel culturable bacteria. *Gut Microbes.* **10**, 77–91 (2019).
74. Moore, W.E., Holdeman, L.V.: Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* **27**, 961–79 (1974).
75. Rajilić-Stojanović, M., de Vos, W.M.: The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 996–1047 (2014).
76. Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace, N.R., Gordon, J.I.: Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe.* **3**, 417–27 (2008).
77. Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., Gu, Y.: A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* **13**, 341 (2012).
78. Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M.: Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 251364 (2012).
79. Islam, S.U.: Clinical Uses of Probiotics. *Medicine.* **95**, e2658 (2016).

80. Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., Philippart de Foy, J.-M., Dequenne, I., de Timary, P., Cani, P.D.: How Probiotics Affect the Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 454 (2019).
81. Singh, V.P., Sharma, J., Babu, S., Rizwanulla, null, Singla, A.: Role of probiotics in health and disease: a review. *J. Pak. Med. Assoc.* **63**, 253–57 (2013).
82. Goldenberg, J.Z., Yap, C., Lytvyn, L., Lo, C.K.-F., Beardsley, J., Mertz, D., Johnston, B.C.: Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.* **12**, CD006095 (2017).
83. Wilkins, T., Sequoia, J.: Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am. Fam. Physician.* **96**, 170–78 (2017).
84. Shen, J., Zuo, Z.-X., Mao, A.-P.: Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn’s disease, and pouchitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm. Bowel Dis.* **20**, 21–35 (2014).
85. Paredes-Paredes, M., Flores-Figueroa, J., Dupont, H.L.: Advances in the treatment of travelers’ diarrhea. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **13**, 402–7 (2011).
86. Wullt, M., Johansson Hagslätt, M.-L., Odenholt, I., Berggren, A.: *Lactobacillus plantarum* 299v enhances the concentrations of fecal short-chain fatty acids in patients with recurrent *clostridium difficile*-associated diarrhea. *Dig. Dis. Sci.* **52**, 2082–86 (2007).
87. Gedek, B.R.: Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses.* **42**, 261–64 (1999).
88. Gueimonde, M., Salminen, S.: New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig. Liver Dis.* **38**, S242–247 (2006).
89. Ronis, M.J.J., Pedersen, K.B., Watt, J.: Adverse Effects of Nutraceuticals and Dietary Supplements. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **58**, 583–601 (2018).
90. Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S.: Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 454–60 (2007).

91. O'Callaghan, J., Buttó, L.F., MacSharry, J., Nally, K., O'Toole, P.W.: Influence of adhesion and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* on the intestinal epithelial cell transcriptional response. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5196–5203 (2012).
92. Plaza-Díaz, J., Fontana, L., Gil, A.: Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients.* **10**, 1038 (2018).
93. Hegarty, J.W., Guinane, C.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D.: Lack of Heterogeneity in Bacteriocin Production Across a Selection of Commercial Probiotic Products. *Probiotics Antimicrob Proteins.* **9**, 459–65 (2017).
94. Natural Skin Care: Probiotic Skin Care: Body Regeneration Product. [online] Dostupné z URL: <<https://www.ascendedhealth.com/>> [cit. 22. 3. 2021].
95. Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.-Y.: Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 1171–85 (2006).
96. Shahani, K.M., Chandan, R.C.: Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* **62**, 1685–94 (1979).
97. Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A.G., Ruzzi, M.: Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients.* **11**, 1189 (2019).
98. Ouwehand, A.C., Derrien, M., de Vos, W., Tiihonen, K., Rautonen, N.: Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 212–17 (2005).
99. Slavin, J.: Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients.* **5**, 1417–35 (2013).
100. Holscher, H.D.: Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes.* **8**, 172–84 (2017).
101. Chung, W.S.F., Walker, A.W., Louis, P., Parkhill, J., Vermeiren, J., Bosscher, D., Duncan, S.H., Flint, H.J.: Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* **14**, 3 (2016).

102. Markowiak, P., Śliżewska, K.: Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. **9**, 1021 (2017).
103. van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H., Smits, G.: On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 525–52 (1995).
104. Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700 (1993).
105. Strathdee, F., Free, A.: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Methods Mol. Biol.* **1054**, 145–57 (2013).
106. Abrams, E.S., Murdaugh, S.E., Lerman, L.S.: Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC clamp. *Genomics*. **7**, 463–75 (1990).
107. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–67 (1977).
108. Heather, J.M., Chain, B.: The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. **107**, 1–8 (2016).
109. Behjati, S., Tarpey, P.S.: What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **98**, 236–38 (2013).
110. McGinn, S., Gut, I.G.: DNA sequencing-spanning the generations. *N. Biotechnol.* **30**, 366–72 (2013).
111. Fliegerova, K., Tapio, I., Bonin, A., Mrazek, J., Callegari, M.L., Bani, P., Bayat, A., Vilkki, J., Kopečný, J., Shingfield, K.J., Boyer, F., Coissac, E., Taberlet, P., Wallace, R.J.: Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe*. **29**, 80–84 (2014).
112. ThermoFisher Scientific. [online] Dostupné z URL: <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014579\\_IonPGM\\_HiQ\\_View\\_OT2\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014579_IonPGM_HiQ_View_OT2_UG.pdf)> [cit. 2. 6. 2021].

113. ThermoFisher Scientific. [online] Dostupné z URL: <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014583\\_IonPGM\\_HiQ\\_View\\_Sequenc\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014583_IonPGM_HiQ_View_Sequenc_UG.pdf)> [cit. 2. 6. 2021].
114. QIIME 2. [online] Dostupné z URL: <<https://www.qiime2.org>> [cit. 2. 6. 2021].
115. Di Segni, A., Braun, T., BenShoshan, M., Farage Barhom, S., Glick Saar, E., Cesarkas, K., Squires, J.E., Keller, N., Haberman, Y.: Guided Protocol for Fecal Microbial Characterization by 16S rRNA-Amplicon Sequencing. *J. Vis. Exp.* **19**, 56845 (2018).
116. Kim, S.-W., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohno, H., Morita, H., Hattori, M.: Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.* **20**, 241–53 (2013).
117. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics: *Clinical evidence and not microbiota outcomes drive value of probiotics*. [online] Dostupné z URL: <<https://isapscience.org/clinical-evidence-not-microbiota-outcomes-drive-value-probiotics/>> [cit. 2. 4. 2021].
118. Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., Preter, V.D., Arijs, I., Eeckhaut, V., Ballet, V., Claes, K., Immerseel, F.V., Verbeke, K., Ferrante, M., Verhaegen, J., Rutgeerts, P., Vermeire, S.: A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* **63**, 1275–83 (2014).
119. Mukhopadhyay, I., Morais, S., Laverde-Gomez, J., Sheridan, P.O., Walker, A.W., Kelly, W., Klieve, A.V., Ouwerkerk, D., Duncan, S.H., Louis, P., Koropatkin, N., Cockburn, D., Kibler, R., Cooper, P.J., Sandoval, C., Crost, E., Juge, N., Bayer, E.A., Flint, H.J.: Sporulation capability and amylosome conservation among diverse human colonic and rumen isolates of the keystone starch-degrader *Ruminococcus bromii*. *Environ. Microbiol.* **20**, 324–36 (2018).
120. Ze, X., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J.: *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME J.* **6**, 1535–43 (2012).

121. Knoll, R.L., Forslund, K., Kultima, J.R., Meyer, C.U., Kullmer, U., Sunagawa, S., Bork, P., Gehring, S.: Gut microbiota differs between children with Inflammatory Bowel Disease and healthy siblings in taxonomic and functional composition: a metagenomic analysis. *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* **312**, G327–39 (2016).
122. Wang, Y., Wan, X., Wu, X., Zhang, C., Liu, J., Hou, S.: *Eubacterium rectale* contributes to colorectal cancer initiation via promoting colitis. *Gut Pathog.* **13**, 2 (2021).
123. Kowalska-Duplaga, K., Gosiewski, T., Kapusta, P., Sroka-Oleksiak, A., Wędrychowicz, A., Pieczarkowski, S., Ludwig-Słomczyńska, A.H., Wołkow, P.P., Fyderek, K.: Differences in the intestinal microbiome of healthy children and patients with newly diagnosed Crohn's disease. *Sci. Rep.* **9**, 18880 (2019).
124. Revest, M., Egmann, G., Cattoir, V., Tattevin, P.: HACEK endocarditis: state-of-the-art. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **14**, 523–30 (2016).
125. Biagi, E., Franceschi, C., Rampelli, S., Severgnini, M., Ostan, R., Turrioni, S., Consolandi, C., Quercia, S., Scurti, M., Monti, D., Capri, M., Brigidi, P., Candela, M.: Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr. Biol.* **26**, 1480–85 (2016).
126. Aagaard, K., Riehle, K., Ma, J., Segata, N., Mistretta, T.-A., Coarfa, C., Raza, S., Rosenbaum, S., Van den Veyver, I., Milosavljevic, A., Gevers, D., Huttenhower, C., Petrosino, J., Versalovic, J.: A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One.* **7**, e36466 (2012).
127. Ferrocino, I., Ponzo, V., Gambino, R., Zarovska, A., Leone, F., Monzeglio, C., Goitre, I., Rosato, R., Romano, A., Grassi, G., Broglio, F., Cassader, M., Cocolin, L., Bo, S.: Changes in the gut microbiota composition during pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus (GDM). *Sci. Rep.* **8**, 12216 (2018).
128. Gao, R., Gao, Z., Huang, L., Qin, H.: Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **36**, 757–69 (2017).
129. Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., Bakar, F.A.: The association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with colorectal tumors: The nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 11 (2011).

130. Jin, Y., Liu, Y., Zhao, L., Zhao, F., Feng, J., Li, S., Chen, H., Sun, J., Zhu, B., Geng, R., Wei, Y.: Gut microbiota in patients after surgical treatment for colorectal cancer. *Environ. Microbiol.* **21**, 772–83 (2019).



# Příloha 1: Procentuální zastoupení všech nalezených bakteriálních druhů v lidských fekálních vzorcích

Data získaná z analýzy NGS na přítomné bakteriální druhy ve fekálních vzorcích poskytnutých jednotlivými dárci. Z uvedených dat byly sestrojeny grafy v kapitole 4.4 (str. 57). Význam zkratk: B – před užitím KPP, P1 – před užitím KPP užívány jiná probiotika, P (P2) – užívání KPP, A – po užití KPP

**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce D – graf na Obrázku 7 (str. 58)**

Dárce	D							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1D; B	2D; P	3D; P	4D; P	5D; P	6D; P	7D; A	8D; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,06%	0,03%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	1,89%	1,61%	2,51%	2,20%	2,99%	6,30%	4,44%	2,91%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	4,07%	3,25%	2,32%	2,20%	5,17%	3,47%	1,86%	2,40%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,40%	0,62%	0,00%	0,14%	0,73%	0,00%	0,17%	0,23%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	29,92%	2,06%	7,49%	11,81%	8,25%	12,12%	8,98%	28,08%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	0,59%	0,03%	0,00%	0,99%	0,14%	0,79%	0,11%	0,96%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae</i>	4,41%	0,28%	0,14%	1,10%	1,19%	3,16%	3,31%	2,68%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	1,21%	0,06%	0,14%	1,02%	0,48%	0,73%	0,17%	0,76%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	1,30%	0,00%	0,00%	0,23%	0,08%	0,08%	0,14%	0,42%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	0,00%	0,00%	0,20%	0,03%	0,08%	0,00%	0,06%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,11%	0,28%	0,48%	0,37%	1,92%	0,25%	3,08%	1,16%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	0,08%	0,08%	0,00%	0,54%	0,03%	0,31%	0,20%	1,36%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	5,71%	15,56%	12,20%	2,37%	12,29%	3,73%	10,28%	2,57%

Dárce	D							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1D; B	2D; P	3D; P	4D; P	5D; P	6D; P	7D; A	8D; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	<b>0,03%</b>	<b>0,08%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,11%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	<b>21,69%</b>	<b>36,02%</b>	<b>30,85%</b>	<b>33,64%</b>	<b>30,34%</b>	<b>34,69%</b>	<b>23,05%</b>	<b>28,59%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	<b>3,02%</b>	<b>7,23%</b>	<b>11,36%</b>	<b>5,34%</b>	<b>9,04%</b>	<b>3,11%</b>	<b>2,94%</b>	<b>3,16%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	<b>16,67%</b>	<b>25,11%</b>	<b>22,88%</b>	<b>24,44%</b>	<b>13,39%</b>	<b>19,15%</b>	<b>19,66%</b>	<b>15,79%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	<b>0,00%</b>	<b>1,50%</b>	<b>0,31%</b>	<b>0,71%</b>	<b>1,16%</b>	<b>1,16%</b>	<b>1,84%</b>	<b>0,08%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	<b>0,06%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,20%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,14%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	<b>2,88%</b>	<b>2,63%</b>	<b>0,45%</b>	<b>1,44%</b>	<b>5,00%</b>	<b>3,70%</b>	<b>6,05%</b>	<b>2,12%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae</i>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	<b>3,22%</b>	<b>1,16%</b>	<b>4,94%</b>	<b>1,19%</b>	<b>0,20%</b>	<b>0,40%</b>	<b>0,37%</b>	<b>0,76%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	<b>1,38%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>7,91%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,79%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae</i>	<b>0,59%</b>	<b>1,10%</b>	<b>2,43%</b>	<b>0,08%</b>	<b>3,76%</b>	<b>4,97%</b>	<b>12,09%</b>	<b>5,34%</b>
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>1,21%</b>	<b>0,31%</b>	<b>0,28%</b>	<b>0,11%</b>	<b>0,14%</b>	<b>0,25%</b>
"Unassigned"	<b>0,76%</b>	<b>1,33%</b>	<b>0,08%</b>	<b>1,55%</b>	<b>3,39%</b>	<b>0,88%</b>	<b>1,05%</b>	<b>0,23%</b>

**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce DA – graf na Obrázku 8 (str. 59)**

Dárce	DA								
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1DA; P1	2DA; P1	3DA; P2	4DA; P2	5DA; P2	6DA; P2	7DA; P2	8DA; A	9DA; A
Klasifikace									
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,00%	0,07%	0,05%	0,05%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	4,60%	5,88%	8,03%	7,64%	3,07%	5,19%	0,30%	0,16%	0,46%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Micrococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	0,00%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,14%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriales Incertae Sedis</i>	0,00%	0,11%	0,09%	0,09%	0,09%	0,05%	0,16%	0,21%	0,30%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,25%	0,59%	0,43%	0,43%	0,37%	0,21%	0,30%	0,32%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	30,96%	16,04%	30,11%	23,09%	17,35%	9,91%	24,16%	16,11%	22,15%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	1,83%	0,48%	2,15%	0,80%	2,06%	0,02%	2,70%	2,84%	0,82%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,16%	0,09%	0,21%	0,07%	0,18%	0,00%	0,27%	0,16%	0,23%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	1,44%	3,39%	5,42%	3,41%	10,57%	3,32%	13,14%	16,34%	7,83%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	4,00%	1,56%	3,46%	1,60%	3,68%	0,39%	3,68%	4,67%	1,26%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%
<i>Bacteria; Cyanobacteria; Melainabacteria; Gastranaerophilales; "gut metagenome"</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,39%	0,11%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Cyanobacteria; Oxyphotobacteria; Chloroplast; "uncultured eukaryote"</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,18%	0,98%	0,66%	0,76%	0,25%	0,89%	0,37%	0,27%	0,07%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	0,00%	0,43%	0,41%	0,02%	3,25%	0,43%	1,72%	1,24%	0,18%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,76%	0,34%	0,02%	0,00%	0,48%	0,55%	0,21%	0,18%	0,00%

Dárce	DA								
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1DA; P1	2DA; P1	3DA; P2	4DA; P2	5DA; P2	6DA; P2	7DA; P2	8DA; A	9DA; A
Klasifikace									
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales vadinBB60 group</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,25%	0,05%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacteriaceae</i>	0,00%	0,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	0,05%	0,30%	0,25%	0,02%	0,34%	0,00%	0,21%	0,30%	0,39%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	28,10%	36,89%	18,97%	31,14%	21,08%	34,19%	16,18%	28,44%	32,31%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	0,66%	1,10%	0,82%	0,41%	0,62%	1,05%	0,25%	0,23%	0,71%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	21,26%	21,72%	22,31%	23,75%	25,33%	34,37%	27,62%	22,29%	24,12%
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,16%	0,55%	0,23%	0,43%	0,78%	0,53%	0,48%	0,34%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	1,65%	4,10%	2,13%	3,16%	4,05%	3,62%	1,69%	1,72%	2,29%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; "uncultured"</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,48%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Mitochondria</i>	0,00%	0,21%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	1,67%	0,39%	0,69%	0,16%	1,33%	0,00%	0,39%	0,50%	2,29%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,26%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Izimaplasmatales; "gut metagenome"</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,07%	0,00%	0,25%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "uncultured bacterium"</i>	0,00%	0,23%	0,00%	0,07%	0,14%	0,71%	0,37%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	0,21%	0,23%	0,16%	0,00%	0,11%	0,00%	0,14%	0,00%	0,00%
"Unassigned"	2,04%	4,10%	3,32%	2,88%	4,78%	4,19%	4,49%	3,41%	3,34%

**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce DK – graf na Obrázku 9 (str. 60)**

Dárce	DK							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1DK; B	2DK; P	3DK; P	4DK; P	5DK; P	6DK; P	7DK; A	8DK; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,05%	0,08%	0,14%	0,05%	0,03%	0,11%	0,05%	0,12%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	4,12%	6,38%	13,48%	1,38%	10,49%	12,65%	6,37%	7,82%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Micrococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	3,77%	5,84%	5,65%	3,87%	7,62%	6,94%	4,45%	4,24%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,18%	1,10%	0,66%	0,65%	1,83%	1,58%	0,99%	0,74%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	41,54%	26,48%	23,27%	42,49%	17,59%	22,68%	30,93%	8,36%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,08%	0,00%	0,03%	0,04%	0,04%	0,05%	0,05%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae</i>	0,00%	0,34%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae</i>	0,36%	0,25%	0,06%	0,29%	0,03%	0,00%	0,08%	0,05%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	2,63%	1,57%	2,96%	4,53%	1,75%	2,20%	2,25%	1,40%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	7,05%	5,00%	2,93%	3,15%	2,99%	5,78%	12,36%	0,93%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Family XI</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	0,00%	0,15%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,42%	4,25%	1,48%	0,73%	1,68%	0,95%	1,80%	0,78%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	0,57%	2,24%	0,54%	0,38%	0,25%	0,28%	0,00%	0,05%

Dárce	DK							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1DK; B	2DK; P	3DK; P	4DK; P	5DK; P	6DK; P	7DK; A	8DK; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,00%	0,28%	0,00%	0,08%	0,38%	0,02%	0,00%	0,92%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XI</i>	0,00%	0,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	0,11%	0,50%	0,48%	0,20%	0,53%	0,27%	0,24%	0,09%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	26,70%	28,88%	34,81%	25,63%	44,14%	37,59%	29,64%	53,53%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	1,25%	5,00%	0,68%	0,84%	2,82%	0,11%	0,37%	1,85%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	6,30%	6,45%	8,18%	12,72%	5,39%	5,50%	7,15%	13,94%
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,70%	0,59%	1,14%	0,31%	1,08%	0,65%	0,38%	0,89%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	1,18%	1,09%	1,31%	1,16%	0,24%	0,39%	0,43%	0,18%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	0,00%	0,14%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; "uncultured"</i>	0,20%	0,13%	0,00%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Mitochondria</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,08%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	1,56%	0,12%	0,08%	0,44%	0,00%	0,41%	0,55%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	0,01%	1,10%	0,01%	0,11%	0,05%	0,00%	0,42%	0,20%
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	0,19%	0,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,57%	0,19%	0,36%
"Unassigned"	1,04%	1,67%	2,11%	0,83%	1,09%	1,23%	1,31%	3,46%

**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce EJ – graf na Obrázku 10 (str. 61)**

Dárce	EJ							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1EJ; B	2EJ; P	3EJ; P	4EJ; P	5EJ; P	6EJ; P	7EJ; A	8EJ; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,05%	0,02%	0,03%	0,08%	0,01%	0,00%	0,04%	0,02%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	0,97%	1,72%	8,70%	1,28%	3,83%	2,19%	2,55%	2,59%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Micrococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	0,64%	0,60%	0,99%	0,49%	0,43%	1,55%	0,84%	0,76%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,35%	0,13%	0,46%	0,05%	0,17%	0,54%	0,58%	0,30%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; "uncultured"</i>	0,04%	0,14%	0,00%	0,01%	0,05%	0,00%	0,07%	0,06%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	44,31%	41,55%	33,98%	44,00%	35,47%	37,24%	39,56%	41,16%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	1,87%	1,42%	0,63%	0,82%	0,98%	0,96%	2,20%	1,30%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,35%	0,12%	0,05%	0,20%	0,29%	0,09%	0,45%	0,11%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae</i>	3,30%	0,57%	1,09%	2,94%	0,36%	0,56%	0,41%	0,96%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	1,50%	0,26%	0,15%	0,43%	0,66%	1,36%	0,79%	0,36%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	6,97%	2,85%	1,42%	7,09%	1,68%	2,16%	4,81%	3,58%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,00%	0,09%	0,07%	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	0,07%	0,00%	0,00%	0,09%	0,00%	0,03%	0,00%	0,04%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,00%	0,00%	0,07%	0,00%	0,00%	0,37%	0,03%	0,00%

Dárce	EJ							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1EJ; B	2EJ; P	3EJ; P	4EJ; P	5EJ; P	6EJ; P	7EJ; A	8EJ; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	0,06%	0,03%	0,02%	0,06%	0,03%	0,05%	0,04%	0,05%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	16,28%	26,78%	24,22%	20,83%	26,11%	26,30%	22,91%	20,49%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	0,13%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,08%	0,23%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	18,20%	20,21%	24,75%	15,25%	26,48%	22,75%	20,40%	23,99%
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,01%	0,03%	0,09%	0,07%	0,06%	0,06%	0,08%	0,01%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	0,65%	0,36%	0,35%	1,65%	0,44%	0,73%	0,31%	0,42%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	0,00%	1,04%	0,05%	0,49%	0,29%	0,00%	0,19%	0,00%
<i>Bacteria; Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	1,32%	0,00%	0,06%	2,08%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>	0,05%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	1,89%	0,98%	2,06%	0,88%	1,22%	1,30%	0,77%	1,30%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	0,35%	0,16%	0,12%	0,33%	0,21%	0,31%	0,20%	0,26%
"Unassigned"	1,93%	0,96%	0,71%	1,55%	1,21%	1,23%	0,37%	2,23%



**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce JJ – graf na Obrázku 11 (str. 62)**

Dárce Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku Klasifikace	JJ							
	1JJ; B	2JJ; P	3JJ; P	4JJ; P	5JJ; P	6JJ; P	7JJ; A	8JJ; A
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,09%	0,04%	0,00%	0,02%	0,00%	0,03%	0,08%	0,06%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	0,33%	0,77%	0,08%	0,23%	0,23%	0,14%	0,25%	2,10%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Corynebacteriaceae</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	5,80%	3,69%	3,00%	8,02%	3,74%	4,74%	4,55%	11,44%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriales Incertae Sedis</i>	0,01%	0,00%	0,10%	0,04%	0,00%	0,00%	0,07%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,36%	0,37%	0,32%	0,26%	0,00%	0,28%	0,56%	0,10%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	40,07%	34,69%	35,14%	26,91%	33,30%	35,91%	44,04%	34,26%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	0,53%	0,93%	1,12%	1,38%	0,34%	1,38%	0,96%	0,53%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,23%	0,24%	0,19%	0,20%	0,19%	0,03%	0,14%	0,10%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	8,10%	8,30%	11,06%	11,42%	11,23%	9,53%	7,11%	4,21%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	1,87%	1,22%	1,32%	1,65%	1,50%	1,22%	2,30%	0,52%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Family XI</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Aerococcaceae</i>	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,47%	0,04%	0,07%	0,15%	0,06%	0,92%	1,35%	0,13%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,07%	0,01%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,48%	0,09%	0,09%	1,69%	0,21%	0,05%	0,11%	0,61%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XI</i>	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Dárce	JJ							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1JJ; B	2JJ; P	3JJ; P	4JJ; P	5JJ; P	6JJ; P	7JJ; A	8JJ; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	<b>0,23%</b>	<b>0,21%</b>	<b>0,22%</b>	<b>0,29%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,88%</b>	<b>2,44%</b>	<b>4,15%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	<b>24,06%</b>	<b>30,73%</b>	<b>33,99%</b>	<b>25,96%</b>	<b>34,20%</b>	<b>28,53%</b>	<b>17,54%</b>	<b>28,51%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	<b>1,59%</b>	<b>0,76%</b>	<b>0,39%</b>	<b>2,39%</b>	<b>0,71%</b>	<b>0,91%</b>	<b>0,56%</b>	<b>1,07%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	<b>9,37%</b>	<b>15,07%</b>	<b>10,46%</b>	<b>15,60%</b>	<b>11,04%</b>	<b>13,84%</b>	<b>11,32%</b>	<b>8,31%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	<b>0,33%</b>	<b>0,21%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,13%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,06%</b>	<b>0,04%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	<b>0,33%</b>	<b>0,31%</b>	<b>0,30%</b>	<b>0,60%</b>	<b>1,06%</b>	<b>0,22%</b>	<b>0,64%</b>	<b>0,47%</b>
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae</i>	<b>0,03%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; "uncultured"</i>	<b>0,10%</b>	<b>0,18%</b>	<b>0,40%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,16%</b>	<b>0,20%</b>	<b>0,35%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	<b>1,40%</b>	<b>0,68%</b>	<b>0,40%</b>	<b>0,61%</b>	<b>0,23%</b>	<b>0,14%</b>	<b>1,54%</b>	<b>0,51%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	<b>1,75%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,02%</b>	<b>0,05%</b>	<b>1,20%</b>
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae</i>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "gut metagenome"</i>	<b>0,03%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,68%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "uncultured bacterium"</i>	<b>0,03%</b>	<b>0,04%</b>	<b>0,08%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,25%</b>	<b>0,00%</b>
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	<b>0,15%</b>	<b>0,28%</b>	<b>0,11%</b>	<b>0,16%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,13%</b>	<b>0,00%</b>
"Unassigned"	<b>2,17%</b>	<b>1,11%</b>	<b>0,98%</b>	<b>2,11%</b>	<b>1,74%</b>	<b>0,87%</b>	<b>2,87%</b>	<b>1,72%</b>

**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce K – graf na Obrázku 12 (str. 63)**

Dárce	K					
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1K; B	2K; P	3K; P	4K; P	5K; P	6K; A
Klasifikace						
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,09%	0,36%	0,22%	0,43%	0,39%	0,15%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	2,53%	3,23%	2,29%	5,89%	7,08%	1,74%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Propionibacteriales; Propionibacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	5,12%	4,65%	2,23%	7,60%	14,39%	3,58%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriales Incertae Sedis</i>	1,63%	1,54%	0,79%	1,89%	2,98%	1,32%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,43%	0,55%	0,31%	0,90%	0,91%	0,85%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	13,57%	3,90%	8,75%	2,08%	3,32%	4,35%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	0,90%	0,73%	0,67%	0,36%	0,36%	1,33%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,21%	0,01%	0,04%	0,00%	0,03%	0,12%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Muribaculaceae</i>	0,30%	0,61%	1,32%	0,16%	0,13%	0,33%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,12%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae</i>	0,04%	0,00%	0,00%	0,09%	0,06%	0,03%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	1,81%	0,72%	2,15%	0,73%	0,67%	4,65%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	2,90%	0,64%	1,11%	0,18%	0,60%	0,96%
<i>Bacteria; Epsilonbacteraeota; Campylobacteria; Campylobacteriales; Campylobacteraceae</i>	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,06%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Enterococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,07%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,81%	0,36%	0,18%	0,67%	0,19%	0,39%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	5,07%	3,85%	3,20%	2,42%	3,17%	6,06%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,96%	0,06%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales vadinBB60 group</i>	0,10%	0,33%	0,12%	0,12%	0,06%	0,07%

Dárce	K					
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1K; B	2K; P	3K; P	4K; P	5K; P	6K; A
Klasifikace						
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	0,03%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XI</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,07%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	1,27%	1,35%	1,08%	2,83%	3,37%	2,02%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	25,91%	34,95%	33,77%	36,56%	26,00%	34,40%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae</i>	0,04%	0,00%	0,07%	0,00%	0,01%	0,03%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	0,43%	1,74%	0,93%	0,00%	0,01%	0,93%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	31,87%	39,26%	37,81%	35,37%	32,93%	32,08%
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,07%	0,19%	0,06%	0,34%	0,57%	0,28%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	0,91%	0,22%	0,81%	0,01%	0,06%	1,02%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Beijerinckiaceae</i>	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; "uncultured"</i>	0,18%	0,01%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Mitochondria</i>	0,00%	0,00%	0,76%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>	0,27%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	1,50%	0,24%	0,00%	0,15%	0,12%	0,06%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	0,03%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Iizimaplasmatales; "uncultured organism"</i>	0,15%	0,10%	0,12%	0,01%	0,06%	0,07%
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	0,33%	0,00%	0,00%	0,16%	0,16%	0,04%
"Unassigned"	1,50%	0,39%	0,93%	0,94%	1,11%	3,01%

**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce MR – graf na Obrázku 13 (str. 64)**

Dárce	MR						
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1MR; B	2MR; P	3MR; P	4MR; P	5MR; P	6MR; P	7MR; A
Klasifikace							
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,00%	0,04%	0,00%	0,00%	0,13%	0,04%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	0,11%	2,17%	2,32%	0,19%	1,76%	0,59%	9,05%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Atopobiaceae</i>	0,00%	0,06%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,17%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	0,76%	1,76%	3,12%	1,36%	2,08%	1,25%	2,63%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriales Incertae Sedis</i>	0,00%	0,17%	0,19%	0,08%	0,28%	0,15%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,28%	0,49%	2,08%	0,40%	1,32%	0,62%	1,10%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	40,28%	28,62%	29,62%	36,99%	24,77%	22,48%	36,80%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	1,44%	2,46%	1,91%	0,36%	2,93%	0,62%	1,38%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,53%	0,25%	0,23%	0,19%	0,17%	0,06%	0,70%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Muribaculaceae</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,04%	0,02%	0,04%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	2,15%	4,53%	3,82%	1,83%	3,44%	3,85%	4,33%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	1,13%	0,93%	2,06%	1,40%	1,91%	1,70%	1,30%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Carnobacteriaceae</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Enterococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,08%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,13%	0,04%	0,53%	0,62%	0,62%	0,30%	0,59%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	0,40%	0,72%	0,87%	1,42%	0,55%	0,98%	0,34%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,00%	0,23%	0,06%	0,13%	0,93%	0,25%	0,04%

Dárce	MR						
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1MR; B	2MR; P	3MR; P	4MR; P	5MR; P	6MR; P	7MR; A
Klasifikace							
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales vadinBB60 group</i>	0,00%	0,00%	0,04%	0,11%	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Defluviitaleaceae</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	0,00%	0,30%	0,21%	0,11%	0,15%	0,11%	0,11%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	32,57%	29,79%	21,78%	25,26%	32,38%	33,72%	22,43%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	0,13%	1,34%	1,21%	0,45%	0,85%	0,89%	1,06%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	14,57%	23,62%	24,07%	24,50%	21,58%	27,45%	14,57%
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,17%	0,21%	0,59%	0,25%	0,68%	0,32%	0,23%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	0,30%	0,32%	0,25%	0,38%	0,19%	0,17%	0,19%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%
<i>Bacteria; Lentisphaerae; Lentisphaeria; Victivallales; Victivallaceae</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; "uncultured"</i>	1,70%	0,28%	0,23%	0,40%	0,19%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>	0,17%	0,11%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,17%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	2,38%	0,59%	0,96%	0,74%	0,23%	0,06%	1,15%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,04%	0,00%	0,00%	0,08%	0,06%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Izimaplasmatales; "uncultured organism"</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	0,00%	0,32%	0,08%	0,11%	0,45%	0,13%	0,17%
"Unassigned"	0,81%	0,57%	3,61%	2,66%	2,34%	4,06%	1,32%

**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce R – graf na Obrázku 14 (str. 65)**

Dárce	R							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1R; B	2R; P	3R; P	4R; P	5R; P	6R; P	7R; A	8R; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,10%	0,18%	0,18%	0,05%	0,08%	0,15%	0,21%	0,10%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Atopobiaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	0,85%	0,59%	0,75%	0,93%	0,31%	0,87%	0,26%	0,75%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,18%	0,21%	0,00%	0,05%	0,21%	0,13%	0,10%	0,10%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	44,67%	8,71%	21,05%	28,48%	43,13%	25,26%	28,66%	10,92%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,08%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,31%	0,00%	0,13%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	0,10%	0,08%	0,10%	0,46%	0,93%	0,95%	4,68%	0,08%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,03%	0,03%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	0,49%	1,98%	0,75%	0,82%	0,77%	0,90%	0,80%	0,72%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,10%	0,08%	0,10%	0,23%	0,21%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,13%	0,00%	0,64%	0,00%	0,21%	0,00%	0,00%	0,03%

Dárce	R							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1R; B	2R; P	3R; P	4R; P	5R; P	6R; P	7R; A	8R; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	0,13%	0,33%	0,03%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	19,46%	41,07%	33,36%	39,42%	24,44%	48,75%	39,22%	54,05%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	0,39%	0,49%	0,31%	1,80%	0,67%	1,18%	0,10%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	28,27%	35,95%	35,54%	21,13%	24,26%	16,17%	20,43%	27,78%
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,00%	3,11%	1,29%	0,90%	0,80%	1,57%	1,95%	1,54%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	0,00%	0,15%	0,05%	0,00%	0,51%	0,23%	0,26%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	1,75%	3,34%	1,41%	1,54%	1,31%	0,41%	1,67%	2,52%
<i>Bacteria; Fusobacteria; Fusobacteriia; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae</i>	0,57%	0,98%	2,24%	2,03%	0,85%	0,36%	0,00%	0,15%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Mitochondria</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,28%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	1,18%	0,64%	0,87%	1,21%	0,26%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	1,00%	1,00%	0,31%	0,03%	0,00%	0,69%	0,00%	0,13%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
"Unassigned"	0,87%	1,46%	0,72%	0,59%	1,03%	1,59%	1,36%	0,85%



**Bakteriální zastoupení ve fekálních vzorcích od dárce S – graf na Obrázku 15 (str. 66)**

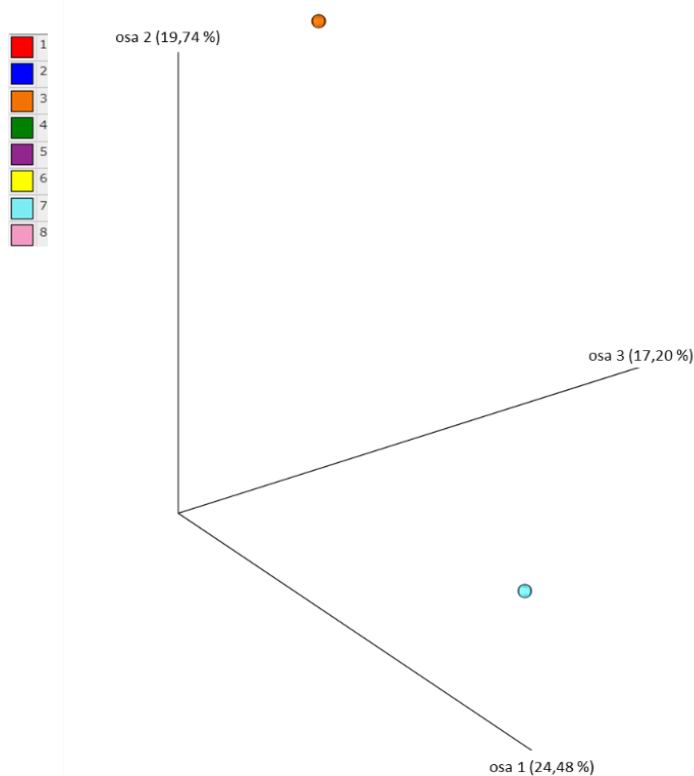
Dárce Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku Klasifikace	S							
	1S; B	2S; P	3S; P	4S; P	5S; P	6S; P	7S; A	8S; A
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae</i>	0,35%	0,18%	0,32%	0,08%	0,09%	0,00%	0,07%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Micrococcaceae</i>	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Atopobiaceae</i>	0,32%	0,22%	0,23%	0,19%	0,08%	0,12%	0,21%	0,07%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriaceae</i>	8,64%	2,24%	3,10%	5,11%	2,43%	1,68%	1,45%	1,81%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Coriobacteriales Incertae Sedis</i>	0,83%	0,47%	1,11%	1,00%	0,23%	0,26%	0,20%	0,09%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; Eggerthellaceae</i>	0,49%	0,42%	0,00%	0,00%	0,21%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia; Coriobacteriales; "uncultured"</i>	2,65%	0,92%	1,03%	0,57%	0,39%	0,18%	0,30%	0,24%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae</i>	18,37%	21,32%	24,38%	35,56%	35,55%	41,68%	44,45%	39,68%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Barnesiellaceae</i>	0,59%	0,15%	0,85%	1,63%	3,03%	1,41%	3,08%	3,38%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinifilaceae</i>	0,02%	0,05%	0,11%	0,27%	0,30%	0,25%	0,26%	0,19%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	2,33%	1,17%	3,47%	2,28%	5,03%	2,39%	4,29%	7,39%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Tannerellaceae</i>	0,30%	0,13%	0,52%	0,63%	0,26%	0,53%	0,34%	0,50%
<i>Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	0,00%	0,01%	0,03%	0,01%	0,01%	0,02%	0,04%	0,03%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Enterococcaceae</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae</i>	2,25%	0,14%	0,47%	0,30%	0,27%	0,23%	0,80%	0,30%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae</i>	8,71%	4,79%	2,69%	2,10%	3,00%	1,27%	0,63%	0,90%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1</i>	0,45%	2,76%	0,64%	0,07%	0,84%	0,23%	0,05%	0,60%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales vadinBB60 group</i>	0,33%	0,20%	0,02%	0,02%	0,70%	0,00%	0,18%	0,18%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Defluviitaleaceae</i>	0,00%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%

Dárce	S							
Číslo vzorku dárce; odběr fekálního vzorku	1S; B	2S; P	3S; P	4S; P	5S; P	6S; P	7S; A	8S; A
Klasifikace								
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacteriaceae</i>	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Family XIII</i>	0,81%	1,11%	0,60%	0,47%	0,37%	0,10%	0,43%	0,13%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae</i>	12,52%	18,18%	26,29%	21,15%	16,81%	23,72%	19,22%	22,80%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae</i>	0,05%	0,01%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae</i>	0,79%	0,54%	1,28%	1,98%	0,73%	0,50%	0,61%	0,70%
<i>Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae</i>	28,92%	34,23%	25,13%	20,28%	19,86%	20,83%	17,24%	16,03%
<i>Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,78%	0,48%	0,62%	0,20%	0,07%	0,03%	0,18%	0,07%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Acidaminococcaceae</i>	1,57%	1,97%	0,49%	0,34%	1,33%	1,04%	0,82%	0,62%
<i>Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Lentisphaerae; Lentisphaeria; Victivallales; Victivallaceae</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,01%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; "uncultured"</i>	0,06%	0,02%	0,00%	0,08%	0,06%	0,02%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>	0,60%	1,31%	0,67%	0,60%	1,72%	0,81%	0,27%	0,89%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae</i>	0,22%	0,07%	0,07%	1,05%	0,72%	0,00%	0,02%	0,13%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	0,00%	0,00%	0,77%	0,04%	0,02%	0,00%	0,27%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae</i>	0,00%	0,00%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,11%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Izimaplasmatales; "uncultured organism"</i>	0,03%	0,13%	0,03%	0,13%	0,56%	0,00%	0,02%	0,00%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "uncultured bacterium"</i>	0,00%	0,00%	0,04%	0,04%	0,01%	0,02%	0,11%	0,04%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "uncultured bacterium adhufec202"</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Tenericutes; Mollicutes; Mollicutes RF39; "unidentified"</i>	0,00%	0,02%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Akkermansiaceae</i>	0,03%	0,00%	0,00%	0,09%	0,02%	0,00%	0,02%	0,00%
"Unassigned"	6,98%	6,71%	4,94%	3,68%	5,26%	2,68%	4,38%	3,12%

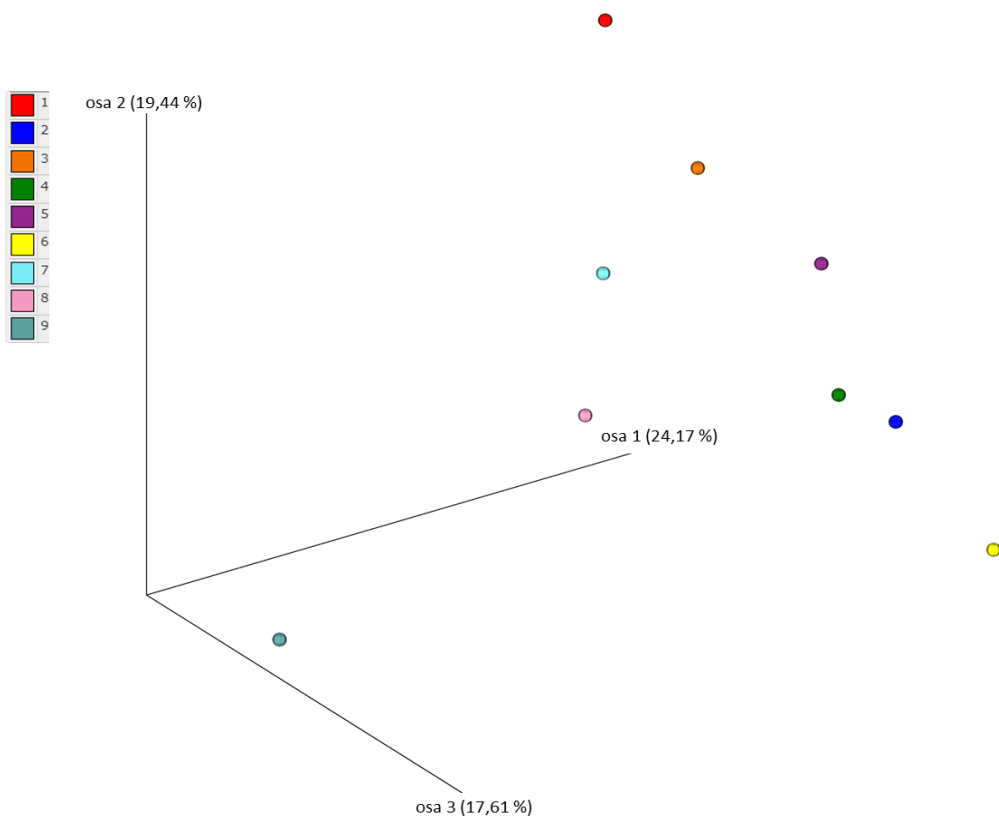
## Příloha 2: Diagramy PCoA znázorňující bakteriální biodiverzitu mezi vzorky souboru

Diagramy PCoA všech dárců bez dárce R, ukazující podobnost, respektive nepodobnost odebraných fekálních vzorků. Čísla u barevné legendy označují pořadí, ve kterém byly vzorky odebrány (1 – před užitím KPP, 2–6 – během užívání KPP, 7–8 – po ukončení užívání KPP).

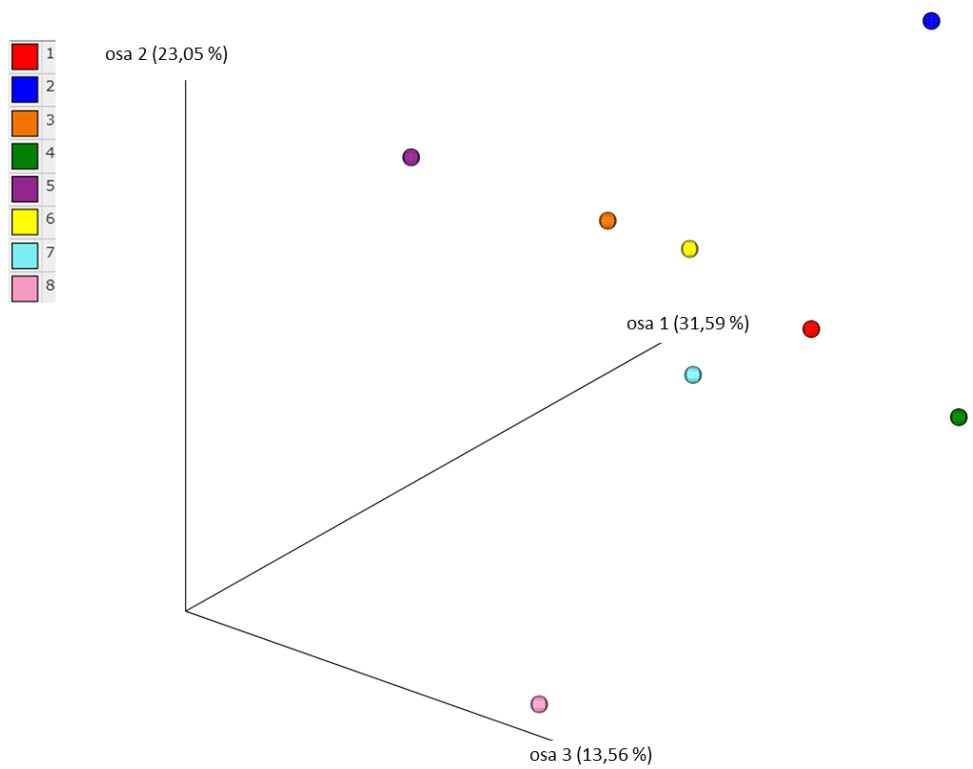
- Dárce D



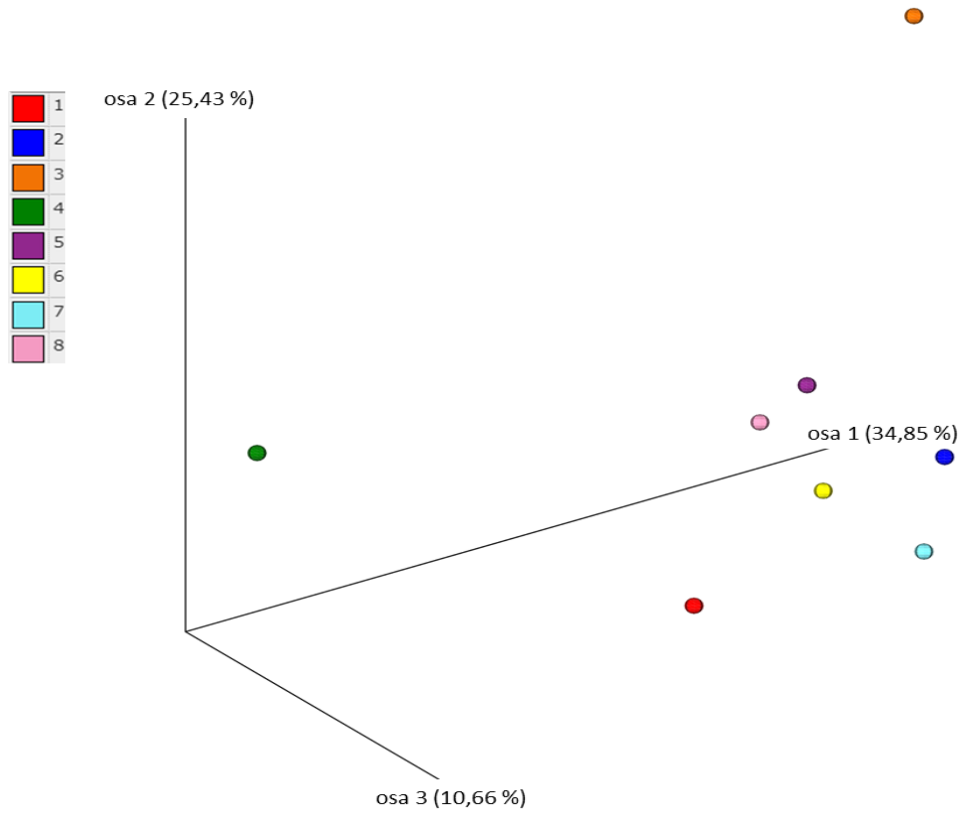
- Dárce DA (1–2 – před užitím KPP, 3–7 – během užívání KPP, 8–9 – po ukončení užívání KPP)



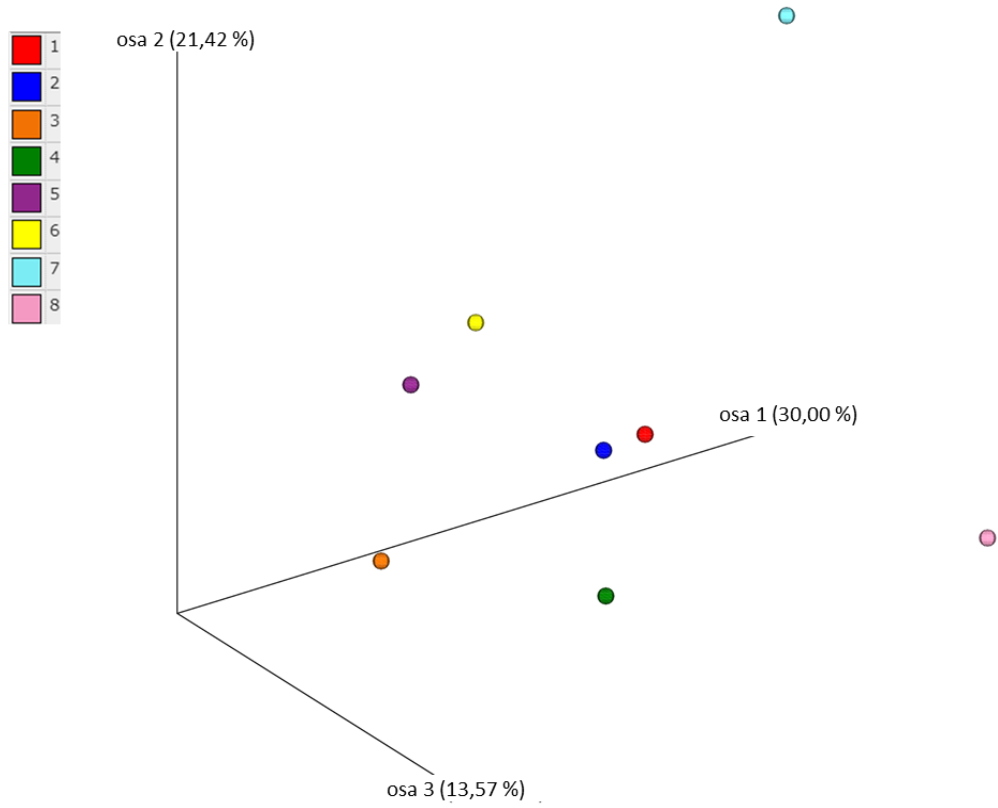
- Dárce DK



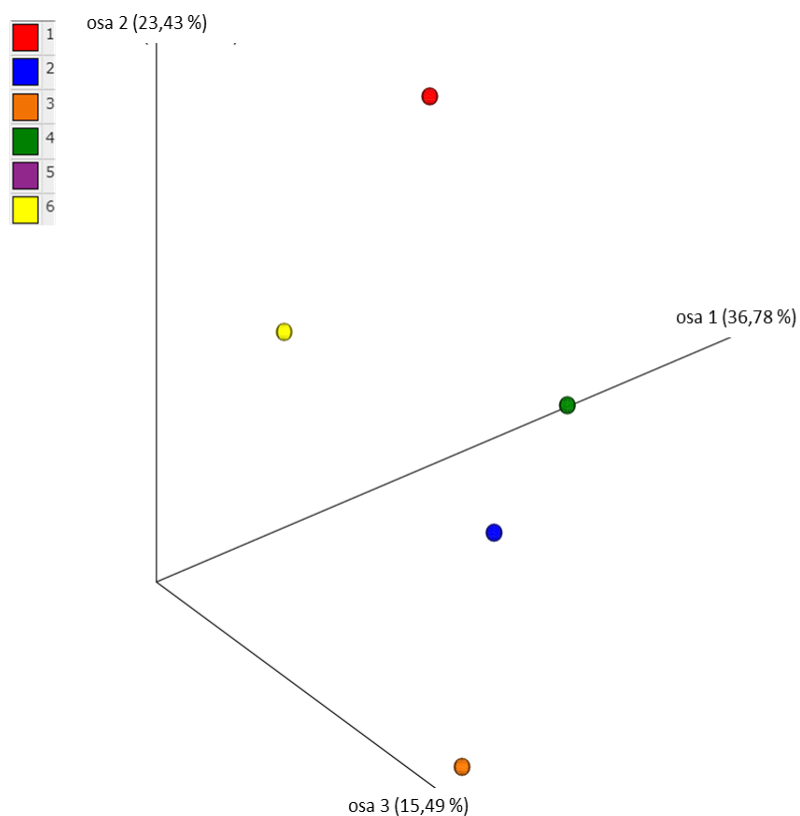
- Dárce EJ



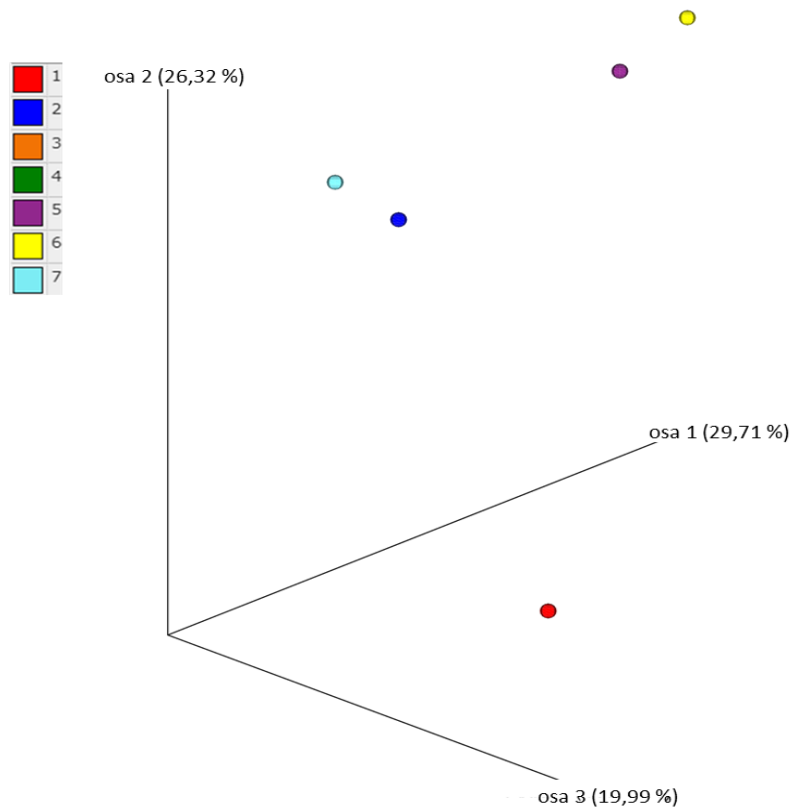
- Dárce JJ



- Dárce K (1 – před užitím KPP, 2–5 – během užívání KPP, 6 – po ukončení užívání KPP)



- Dárce MR (1 – před užitím KPP, 2–6 – během užívání KPP, 7 – po ukončení užívání KPP)



- Dárce S

