

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mikrobiom trávicí soustavy koní  
Bakalářská práce**

**Autor práce: Anežka Šebková  
Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty**

**Vedoucí práce: Ing Denisa Tichá**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikrobiom trávicí soustavy koní" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4.2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí práce Ing. Denise Tiché za cenné rady, materiály a zkušenosti v tomto oboru. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, kamarádům a přátelům, kteří mě po celou dobu podporovali.

# Mikrobiom trávicí soustavy koní

## Souhrn

Práce je zaměřena na složení mikrobiomu trávicího ústrojí koní. Dále na metody, které se zabývají výzkumem tohoto mikrobiomu.

Složení zdravého mikrobiomu gastrointestinálního traktu (GIT) koní zatím není zcela známo, protože zastoupení mikrobiot se může lišit i mezi jedinci stejného druhu. Zvýšený výskyt některých skupin mikroorganismů v trávicím traktu je přitom spojován s projevy různých onemocnění.

Metody, zkoumající mikrobiom GIT koní, lze rozdělit na neinvazivní laboratorní metody, molekulárně genetické metody, kultivační metody a další. Zřejmě vůbec nejvyužívanější metodou je NGS (next generation sequencing), postupně se ale do popředí dostává i metoda MALDI-TOF MS. Tyto metody nahradily historicky velmi využívanou metodu kultivace zejména díky tomu, že nejsou natolik časově náročné.

Mezi mikrobiota, nacházející se v GIT koní, řadíme bakterie, houby, prvoky a viry; nacházejí se přitom prakticky ve všech oddílech trávicího traktu. Dle získaných informací jsou nejzastoupenějšími bakteriálními kmeny v žaludku *Firmicutes* a *Proteobacteria*; a bakteriálními rody *Lactobacillus spp.*, *Moraxella spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Acinetobacter spp.* a *Veloinella spp.* (Perkins et al. 2012). Nejvíce zastoupené bakteriální kmeny v tenkém střevě představují *Firmicutes* a *Bacteroidetes* a rody *Actinobacillus spp.*, *Lactobacillus*; v některých případech také bakteriální rod *Streptococcus*.

Mezi nejpočetnější bakteriální kmeny tlustého a slepého střeva řadíme *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres* a *Actinobacteria*; z čeledí to jsou konkrétně *Lactobacillaceae*, *Acidaminococcaceae* a *Porphyromonadaceae*. V konečniku mezi nejčastěji nalezené bakteriální kmeny patří *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* a výjimečně *Chlamydie*. Ve výkalech jsou nejvíce zastoupené bakteriální kmeny *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Fibrobacteres* a *Cyanobacteria*. V tlustém a slepém střevě, konečniku a výkalech byly navíc nalezeny i některé houby, např. *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyce* a další. Ve výkalech mohou být také nalezeny viry, jako například čeledí *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* a rod *Orthopoxvirus*. V tlustém a slepém střevě byly dále nalezeny prvoci rodu *Blepharocorys* a *Cycloposthium*.

Výzkum mikrobiomu koní má své limity. Novější a spolehlivější metody jeho určování jsou často příliš drahé. Odběr výzkumných vzorků se provádí především z výkalů, zde přítomná mikrobiota ale nemusí odrážet podobu společenství mikroorganismů v žaludku, tlustém či tenkém střevě. Odběr vzorků z těchto částí GIT je poměrně náročný, protože koně se musí nechat uspat, nebo musejí být usmrceni.

Mnoho autorů se domnívá, že zvýšený výskyt některých běžných mikrobiot může být zodpovědný za propuknutí některých onemocnění koní. Budoucí studie by se proto měly především zaměřit na podrobnější zkoumání mikrobiot ve všech částech GIT koní a na využití novějších metod, které mohou zajistit spolehlivější výsledky.

**Klíčová slova:** mikrobiom, koně, střevo, molekulárně biologické metody

# The Digestive Tract Microbiome of Horses

## Summary

The work focuses on the composition of the equine digestive microbiome. Furthermore, it focuses on the methods that investigate this microbiome.

The composition of the healthy equine gastrointestinal tract (GIT) microbiome is not completely known yet, as the representation of microbiota can be different even between individuals of the same species. Increased prevalence of some microorganism groups in the GIT tract has been associated with the manifestation of various diseases.

Methods investigating the equine GIT microbiome can be divided into non-invasive laboratory methods, molecular genetic methods, culture methods and others. The most widespread method is NGS (next generation sequencing), but the MALDI-TOF MS method is gradually gaining ground. These methods have replaced the historically widely used culture method, mainly because they are not as time-consuming.

The microbiota found in the GIT of horses includes bacteria, fungi, protozoa and viruses; they are found in almost all compartments of the digestive tract. According to the collected data, the most abundant bacterial strains in the stomach are *Firmicutes* and *Proteobacteria*; and the bacterial genera are *Lactobacillus spp.*, *Moraxella spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Acinetobacter spp.* and *Veloinella spp.* (Perkins et al. 2012). The most prevalent bacterial strains in the small intestine are *Firmicutes* and *Bacteroidetes* and the genera *Actinobacillus spp.*, *Lactobacillus*; in some cases, the bacterial genus *Streptococcus*.

The most numerous bacterial strains of the colon and caecum are *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres* and *Actinobacteria*; the families are specifically *Lactobacillaceae*, *Acidaminococcaceae* and *Porphyromonadaccaeae*. In the rectum, the most commonly found bacterial strains include *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* and rarely *Chlamydia*. In feces, the most abundant bacterial strains are *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Fibrobacteres* and *Cyanobacteria*. In addition, some fungi such as *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyces* and others have been found in the colon, appendix, rectum and feces. Viruses such as the families *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* and the genus *Orthopoxvirus* may also be found in feces. In addition, protozoa of the genera *Blepharocorys* and *Cycloposthium* have been found in the colon and appendix.

Research on the equine microbiome has its limits. Newer and more reliable methods for its determination are often too expensive. Research sampling is mainly taken from feces, but the microbiota present here may not reflect the form of the community of microorganisms in the stomach, colon or small intestine. Sampling from these parts of the GIT is quite challenging as horses must either be euthanized or killed.

Many authors believe that the increased occurrence of some common microbiota may be responsible for the outbreak of some equine diseases. Future studies should therefore focus primarily on more detailed investigations of the microbiota in all parts of the equine GIT and on the use of more recent methods that may provide more reliable results.

**Keywords:** Microbiome, Horses, Intestine, Molecular Biologic Techniques

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Laboratorní metody zabývající se výzkumem mikrobiomu a mikrobiot trávicího traktu koní .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Neinvazivní metody výzkumu trávicího traktu koní.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Detekce anaerobních hub .....	10
3.1.2 Gastroskopie .....	11
<b>3.2 Molekulárně genetické metody .....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Izolace DNA .....	12
3.2.2 Izolace RNA .....	13
3.2.3 PCR amplifikace.....	13
<b>3.3 Sekvence DNA .....</b>	<b>14</b>
3.3.1 Sangerovo sekvenování .....	14
3.3.2 Pyrosekvenování.....	14
3.3.3 NGS metody určování genomu .....	15
<b>3.4 Další metody určování genomu .....</b>	<b>16</b>
3.4.1 Fluorescence in situ hybridizace UNIT (FISH) .....	16
3.4.2 Makroskopie .....	16
3.4.3 MALDI-TOF MS.....	17
<b>3.5 Kultivační metody .....</b>	<b>17</b>
3.5.1 Kultivační analýza (culturomics).....	18
<b>4 Mikrobiota jednotlivých částí trávicího traktu koní.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Mikrobiota v žaludku koní.....</b>	<b>22</b>
4.1.1 Bakterie v žaludku.....	22
<b>4.2 Mikrobiota v tenkém střevě .....</b>	<b>24</b>
4.2.1 Bakterie tenkého střeva.....	25
<b>4.3 Mikrobiota v tlustém a slepém střevě .....</b>	<b>25</b>
4.3.1 Bakterie tlustého a slepého střeva.....	26
4.3.2 Houby tlustého střeva a slepého střeva.....	27
4.3.3 Prvoci (Protozoa) tlustého a slepého střeva .....	28

<b>4.4</b>	<b>Mikrobiota v konečníku .....</b>	<b>28</b>
4.4.1	Bakterie konečníku .....	28
4.4.2	Houby v konečníku .....	29
<b>4.5</b>	<b>Mikrobiota ve výkalech koní a poníků .....</b>	<b>29</b>
4.5.1	Bakterie ve výkalech koní .....	30
4.5.2	Viry ve výkalech koní a poníků .....	31
4.5.3	Houby ve výkalech koní .....	32
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>43</b>

# 1 Úvod

Mikrobiom trávicí soustavy koní se začal zkoumat již v 90. letech 20. století. V této době byla mikrobiota gastrointestinálního traktu (GIT) koní minimálně prozkoumána. Bylo známo pouze omezené množství mikrobiot v GIT koních i metod k jejich výzkumu (Julliand & Grimm 2016). Tradičně se využívala především Sangerova metoda sekvenování, která až do současnosti slouží jako základ novějším a automatizovaným metodám (Crossley et al. 2020). Další využívanou metodou je gastroskopie, která spadá do neinvazivních metod studií mikrobiomu trávicího traktu koní (Spanton et al. 2019). Metoda kultivační analýzy se historicky využívala poměrně hojně. Protože byla časově velmi náročná, postupně se od ní spíše ustoupilo a byla nahrazena metodami NGS (Next generation sequencing) a MALDI-TOF MS (Abdallah et al. 2017).

Mikrobiom GIT koní je zkoumán především pomocí molekulárně genetických metod. Do těchto metod patří izolace DNA nebo RNA, PCR amplifikace, Sangerovo sekvenování, pyrosekvenování a NGS metody určování genomu. Mezi další metody, které nejsou tolik ve výzkumu mikrobiomu koní využívány, patří Fluorescence in situ hybridizace UNIT, makroskopie a MALDI-TOF MS.

Součástí trávicího ústrojí koní a většiny živočichů jsou mikroorganismy, které pomáhají trávit potravu, upravovat prostředí GIT koní a získávat živiny. Mikrobiota se nacházejí v žaludku, tlustém a slepém střevě i tenkém střevě. Mezi tyto mikroorganismy patří bakterie, viry, houby a prvoci. Mezi nejběžnější bakteriální kmeny v GIT koní řadíme *Bacteroidetes*, *Fusobactera*, *Patescibacteria*, *Epsilobacteraeota*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia* (Paul et al. 2021). Nejvíce zastoupenými prvky v GIT koní jsou *Blepharocorys* a *Cycloposthium* (Hsiung et al. 1930; Kern et al. 1973; Bonhomme-Florentin et al. 1985; Goodson et al. 1988; Mura et al. 2019). Nejběžnější čeledi virů v trávicím traktu koní jsou *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*. Ve výkalech byl dále nalezen také rod *Orthopoxvirus* (Julliand & Grimm 2016). Houby se v trávicím traktu nacházejí v tlustém a slepém střevě a v konečníku, byly nalezeny i ve výkalech. Nejčastějšími houbami jsou rody *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Pecoramyces*, *Caecomyces* a *Cyllamyces* (Gruninger et al. 2014; Edwards et al. 2017).



## **2 Cíl práce**

Cílem práce je zpracování literární rešerše se zaměřením na jednotlivé části trávicího traktu koně ve vztahu k mikrobiomu a popis laboratorních metod, které se k jeho studiu využívají.

### 3 Laboratorní metody zabývající se výzkumem mikrobiomu a mikrobiot trávicího traktu koní

Laboratorní metody pro výzkum mikrobiomu a mikrobiot trávicího traktu koní, slouží k posouzení správného fungování trávicího traktu koní. Vzorky se nejčastěji odebírají z trávicí tekutiny (trávicích hlenů, šťáv), slin a výkalů koní. V těchto vzorcích můžeme nalézt nejrůznější bakterie, viry, prvoky a houby (Julliand & Grimm 2016).

Tradičně byly mikrobi z tlustého střeva zkoumány pomocí metod, založených na kultivaci. V současnosti jsou více využívány laboratorní metody na kultivaci nezávislé, a to z toho důvodu, že jen málo druhů mikrobů střevního prostředí je snadno kultivovatelných. Laboratorní metody zabývající se výzkumem mikrobiot trávicího traktu koní přináší nejnovější aktuální poznatky ohledně mikrobů, kteří žijí v ekosystému uvnitř střev a ohledně kolektivních genomů zadního úseku střeva. Julliand & Grimm (2016) popisují kvantifikaci a diverzitu mikroorganismů pro každé mikrobiální společenstvo v chronologickém pořadí. První byli ve slepém střevě koně v roce 1843 objeveni prvoci. V roce 1897 byly ve střevech koně dále popsány bakterie, v roce 1910 pak jednobuněčné eukaryotické organismy připomínající prvoky, které byly identifikovány jako zoospory anaerobních hub. V roce 1970 byly ve slepém a tlustém střevě poníků objeveny částice podobné bakteriofágům a v roce 1996 došlo k identifikaci *archaea* ve slepém střevě koně (Julliand & Grimm 2016).

Některé novější studie se zaměřují na identifikaci "core microbiome" u koní. Tento termín vyjadřuje souhrnnou genetickou informaci mikrobiálních druhů, která je společná všem zástupcům jednoho druhu živočicha. Hlubší poznání mikrobiomu a "core microbiome" může umožnit zlepšení výživy a zdraví u koní. Tyto novější studie mohou vést ke zlepšení ve vývoji přístrojů pro zdravotní kontrolu koní (Julliand & Grimm 2016). Argenzio (1975) tvrdí, že se předpokládalo, že si koně tvoří a vstřebávají 50 % energie (živin) v tlustém a slepém střevě a 30 % energie koně tvoří a čerpají pouze ze slepého střeva (Glinsky et al. 1976). Dále se předpokládá, že dobře vyvážený mikrobiální ekosystém by mohl zabránit střevním onemocněním (Garner et al. 1978; Julliand & Grimm 2016).

#### 3.1 Neinvazivní metody výzkumu trávicího traktu koní

Neinvazivní metody jsou metody, které nevyužívají nástroje či přístroje, které by pronikaly dovnitř organismu. Zahrnují například neinvazivní koprologické testy, které se používají jak v humánní medicíně, tak veterinární medicíně k diagnostice onemocnění (Coleman et al. 2020). Neinvazivní metody zahrnují například detekci anaerobních hub, gastrokopii, makroskopické hodnocení žaludečního hlenu.

##### 3.1.1 Detekce anaerobních hub

Anaerobní houby jsou mikroby, které degradují vlákninu v zadních úsecích střeva koní. Mezi tyto úseky patří slepé sřevo, vzestupný, sestupný, a příčný tračník a konečník (Mura et al. 2019).

Vzorky pro výzkum těchto anaerobních hub jsou odebírány ze střevního obsahu. Dle metodiky autorů Mura et al. (2019) jsou mikroorganismy zkoumány a posuzovány pomocí knihoven klonů založených na ITS1.

Vykultivované rody anaerobních hub nalezené u koní ve studii Mura et al (2019) byly *Caecomyces* 12 %, *Neocallimastix* 2 %, *Piromyces* 0,3 %, *Anaeromyces* 0,3 %. Výsledky této studie naznačují, že trávicí trakt koní je mnohdy obsazen novými, dosud nekultivovanými anaerobními houbami, které se liší od dříve popsanych hub z předžaludků býložravců. Většina studií zkoumajících houby v trávicím traktu byla provedena především u přežvýkavců. Studií hub provedených v trávicím traktu koní je velmi málo.

Mura et al. (2019) doporučují provést další zkoumání zaměřené na koncentraci, rozmanitost, aktivitu anaerobních hub v celém trávicím traktu koní kvůli rozdílným nálezům mezi segmenty zadních částí střev. Nalezené houby v trávicím traktu působily pozitivně na trávicí trakt koní, jelikož tyto houby rozkládají zbytkové produkty trávení a rostlinnou vlákninu z potravy (Mura et al. 2019).

### **3.1.2 Gastroskopie**

Gastroskopie je rutinní technika prováděná u koní. Slouží k praktickému k hodnocení stavu žaludeční sliznice a je brána jako zlatý standard pro diagnostiku syndromu žaludečních vředů u koní (EGUS)-(Spanton et al. 2019).

Ve studii dle Paula et al. (2021) bylo prováděno vyšetření trávicího traktu u 24 koní. Účelem výzkumu byl podrobný popis mikrobiomu glandulární sliznice a žaludeční tekutiny koní se syndromem žaludečních vředů, žlázového onemocnění žaludku koní (EGGD) a koní se zdravou žaludeční mikrobiotou. Při tomto vyšetření je zvířatům nařízena hladovka 14-18 hodin před vyšetřením.

Dle výsledků studie nebyla zjištěna žádná spojitost mezi onemocněním EGGD a konkrétním bakteriálním druhem, rodem či kmenem (Paul et al. 2021).

## **3.2 Molekulárně genetické metody**

Postup molekulárních metod je různorodý a volí se dle zkoumané oblasti. Využívá se izolace DNA, amplifikace zvoleného úseku DNA nebo RNA a sekvenace. Vzorek je odebírán z krve, z výkalů nebo jiných tekutin či tkání. Ze vzorku se odebírá malá část, ze které se získá DNA například extrakcí. Jedná se tedy v tomto případě o izolaci DNA. Vybere se úsek genu, který chceme zkoumat a gen, dle kterého se budou vzorky posuzovat (Koshy et al. 2017).

Nejčastěji se pracuje s geny pro malou ribozomální podjednotku. Jedná se o 16S RNA u bakterií a 18S u eukaryot. Gen se musí namnožit, aby se dal detekovat. Množení genu se nazývá amplifikace a dosahuje se jí namnožením zvoleného úseku genu pomocí PCR (Zhu et al. 2020).

Namnožené úseky DNA-RNA se dále přečtou, aby se zjistilo, jaké mikroorganismy se ve vzorku nachází. Přečteny jsou všechny báze v daném úseku. Tomuto čtení se říká

sekvenování. Do sekvenování spadá například Sangerova metoda a NGS (Videvall et al. 2017).

### 3.2.1 Izolace DNA

Extrakce genomové DNA je nezbytná pro klonování genů, výběr rekombinantních konstruktů, dále pro taxonomické zařazování (Niemi et al. 2001) a diagnostiku (Müller et al. 1998; Cheng et al. 2006). Extrakce genomové DNA je také rozhodujícím prvním krokem v rozsáhlých epidemiologických studiích (Koshy et al. 2017). Efektivní extrakce vysoce kvalitní DNA je jedním ze základních postupů v molekulární biologii, biochemii a genetických výzkumech. DNA je izolována z krve, výkalů, moči nebo například slin a žíní nebo chlupů. Celkový výtěžek DNA z moči je mnohem nižší než výtěžek DNA ze slin a z krve (Koshy et al. 2017). Autoři Chen et al. (2020) ve své studii představili zrychlenou extrakci DNA, která zahrnuje opakované zmrazování a rozmrazování, které je potřeba k izolaci genomové DNA z mikrobiot, která jsou obsažena v odebraném vzorku. Uvolněná DNA je ze směsi purifikována pomocí směsi fenol-chloroformu a precipitována v 70 % ethanolu k odstranění proteinů, sacharidů, fenolů, RNA (Chen et al. 2020).

Pro ověření účinnosti extrakce a relativní čistoty DNA jsou využívány metody hodnocení na základě celkového výtěžku DNA, koncentrace a hodnocení poměrů čistoty a analýzy elektroforézou na agarózovém gelu. Kvalita izolace DNA je pozorována pomocí PCR testu a stanoví se poměr chromozómů (Koshy et al. 2017).

Při extrakci je DNA čištěna směsí fenol-chloroform a následně je vysrážena v isopropanolu. Takto extrahovaná DNA je kvalitní a vhodná pro molekulární analýzy, jako je PCR, štěpení restrikčními enzymy, hybridizace genomové DNA či konstrukce knihovny genomové DNA (Lee et al. 2003).

Metody extrakce DNA z bakterií a kvasinek trvají několik hodin. Nevýhodou extrakce neboli uvolňování DNA je nutnost několikrát přímo manipulovat se vzorkem během extrakce. Vzorek přitom může být během těchto manipulací kontaminován (Cheng et al. 2006).

Střevní mikrobiom savců je různorodý. A zároveň je to komplexní komunita mikroorganismů, která ovlivňuje zdraví hostitele (Sekirov et al. 2010; Janabi et al. 2016). Mnoho těchto mikroorganismů není možné kultivovat (Staley & Konopka 1985; Rappé & Giovannoni 2003), ale jsou detekovatelné metodami sekvenování nové generace (NGS) (Zhou et al. 2010). Metoda NGS, která je schopna detekovat vzácné nebo odolné bakterie je závislá na extrakci dostatečného množství vysoce kvalitní, čisté DNA z mikrobiomu. Čistota DNA přitom může být snížena přítomností inhibitorů. Ty se uvolňují během extrakce. Mezi tyto inhibitory řadíme organické a fenolické sloučeniny, dvojmocné kationty jako jsou například  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  a těžké kovy. Nečistoty mohou narušit průběh PCR (Wilson 1997). Toto je nutné brát v potaz při čištění vzorku, protože krmiva pro zvířata a zejména pro koně, obsahují fenolické sloučeniny (Dueñas et al. 2004; Naczka & Shahidi 2006; Janabi et al. 2016).

### 3.2.2 Izolace RNA

Cílem této metody je oddělení RNA od DNA za pomoci extrakce kyselým roztokem obsahujícím guanidiniumthiokyanát, octan sodný, fenol, chloroform a poté následuje centrifugace. Za těchto kyselých podmínek zůstává RNA v horní vodné části, oproti tomu DNA a proteiny zůstávají v interfázi nebo ve spodní organické části. Celková RNA se pak získá srážením isopropanolem a může být použita na několik aplikací. Izolace RNA z buněk probíhá za necelé 4 hodiny (Chomczynski & Sacchim 2006).

Pro izolaci RNA z malého množství vzorku postačí stolní mikrocentrifuga. Je možné tuto metodu použít s celkovým objemem menším než 2 ml a lze použít polypropylenové tuby na jedno použití. Izolace RNA obsahuje tyto body: homogenizaci vzorku (sjednocení), extrakci DNA a první a druhé srážení. Kritickým bodem je snaha o zlepšení odstranění DNA a proteinů z DNA. Dále RNA izolace obsahuje solubilizaci RNA a nakonec kvantifikaci RNA (Chomczynski & Sacchim 2006).

Autoři Davidson et al. (2004); Zhao et al. (2009) ve své studii využili metodu izolace RNA z výkalů koní. Byla vyizolována polyA + RNA ze stolice, a to kvůli vysoké hladině bakteriální RNA. K posouzení integrity RNA byl použit bioanalyzátor a ke kvantifikaci byl použit spektrofotometr (NanoDrop). Vzorky byly zpracovány v přísném souladu s manuálem a analyzovány pomocí mechanismu exprese genomu.

### 3.2.3 PCR amplifikace

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je spolehlivá technologie, která se hojně využívá v biologii a lékařském výzkumu (Qiu et al. 2021). PCR se stala jednou z nejcennějších technik současně využívaných v biologických vědách, diagnostice a forezních vědách (Zhu et al. 2020).

PCR je metoda, která využívá způsob vytváření amplikonových databází pro studie mikrobiomu. PCR se užívá k namnožení úseků DNA, které jsou získány pomocí extrakce. Jedná se o část metodiky, která končí sekvenací. Spočívá v tom, že se nejprve extrahuje a přečistí DNA, například pomocí izolačních sad. Tento postup je doporučován projektem Earth Microbiome Project a je široce používán ve studiích humánní i nonhumánní zvířecí mikrobioty. Protokol extrakce DNA zahrnuje mechanickou a chemickou lýzu buněk a postup purifikace DNA, který v součtu zahrnuje až 32 samostatných kroků. Jednou z potenciálně rychlejších a levnějších technik přípravy amplikonových databází je nedávno vyvinutá metoda přímé PCR. Tato metoda minimalizuje počet kroků izolace DNA, protože DNA je jednoduše extrahována v pufru s desetiminutovou úpravou při 95 °C před amplifikací PCR. Pokud je nám známo, přesnost přímé PCR oproti extrakci DNA pro sekvenování 16S rRNA bakteriálních mikrobiomů byla dosud hodnocena pouze jednou. Výsledky tohoto srovnání naznačily, že metoda přímé PCR je velmi užitečnou alternativou k metodě extrakce DNA (Videvall et al. 2017). Při PCR namnožení jsou do reakce dále přidávány primery, dNTP, PCR Master Mix a DNA polymeráza (Mura et al. 2019).

## 3.3 Sekvence DNA

### 3.3.1 Sangerovo sekvenování

V průběhu vývoje metod sekvenování byly vynalezeny nejrůznější modifikace, které byly publikovány již od roku 1975, kdy byla představena analýza sekvenování. Tyto metody zahrnují sekvenování "de novo" a velkou škálu paralelního sekvenování (next generation sequencing). Tradiční metodou je ale Sangerovo sekvenování. Tato metoda není pouze základem novějších a automatizovaných přístupů, ale je i nejběžnějším sekvenovacím přístupem používaným pro ověřování sekvencí, monitorování zkoušek a jako základ mnoha fylogentických anlyz. Při Sangerově sekvenčním přístupu na amplifikovanou DNA nebo komplementární DNA (cDNA) nasedá oligonukleotidový primer. Nově vznikající DNA je následně prodlužována enzymem DNA polymerázy, která do řetězce postupně připojuje 4 běžné deoxynukleotidové trifosfáty nebo řetězce ukončující dideoxynukleotidtrifosfát (ddNTP). Zařazením ddNTP do sekvence je zastaven elongační proces, vznikají tak různě velké fragmenty DNA (Crossley et al. 2020).

Sangerova metoda byla první metodou sekvenování DNA označována také jako "plus a mínus", kterou popsal Sanger a Coulson. Pro tuto metodu byla využívána DNA polymeráza. Byla nalezena *Escherichia coli* a DNA polymeráza z bakteriofágu T4 (Englund, 1971, 1972) s různými nukleosidy trifosfáty. Produkt vygenerovaný polymerázou byl vyhodnocen ionoforézou na acrylamidovém gelu. O dva roky, později Sanger a jeho spolupracovníci metodu vylepšili, prostřednictvím sekvenování oligonukleotidů za pomoci enzymové polymerizace (Sanger et al. 1977; Franca et al. 2002).

### 3.3.2 Pyrosekvenování

Pyrosekvenování je poměrně jednoduchá metoda, která zahrnuje méně kroků a má vyšší detekční limit ve srovnání se Sangerovým sekvenováním. Základním principem pyrosekvenování je uvolnění pyrofosfátu v momentě, když je na koncové části vznikajícího vlákna DNA připojen deoxyribonukleotidtrifosfát. Protože se deoxyribonukleotidtrifosfáty přidávají do reakce postupně a koncentrace pyrofosfátu je průběžně sledována, lze určit sekvenci DNA (Harrington et al. 2013).

Klíčové vlastnosti pyrosekvenování jsou zpracovány například pomocí bezplatného softwarového programu Pyromaker, jehož prostřednictvím mohou uživatelé zadávat sekvence DNA a další parametry pyrosekvenování a generovat očekávané výsledky pyrosekvenování (Harrington et al. 2013).

Přestože nedávné pokroky v přístupech sekvenování nezávislých na kultuře oživily obor mikrobiologie, rychlý sběr a konzervace mikrobiální DNA ve vzorcích, jako jsou výkaly, je rozhodující, aby se zabránilo degradaci cílové DNA nukleázovou aktivitou a šíření aerotolerantních mikrobů. Běžné laboratorní postupy pro zmírnění těchto změn spočívají v rychlém zmrazení vzorků nebo rozptýlení v činidlech inhibujících nukleázy. Vzhledem k tomu, že mnoho mikrobiálních enzymů spojených s nukleázovou aktivitou a proliferací

bakterií jsou hydrolázy, nabízí rychlé vysušení vzorků atraktivní alternativu ke zmrazení a kapalným činidlům pro terénní sběr vzorků v odlehlých oblastech (Theelen et al. 2021).

### 3.3.3 NGS metody určování genomu

Jedná se o sekvenování DNA neboli také sekvenování nové generace (NGS) (Kauter et al. 2019).

Sekvenování nové generace (NGS) se rapidně stává nedílnou součástí biologických a biomedicínských věd. Kontroluje kvalitu při přípravě knihoven genů DNA. NGS je nezbytná pro získávání kvalitních a nezkreslených výsledků sekvenování (Papic et al. 2016).

V lékařském a genomickém výzkumu hraje významnou roli NGS. V současné době se data NGS začala produkovat rychlostí 10 TB denně a představují tak výzvu pro uložení a zpracování dat v datových kapacitách. Tato metoda slouží například k odhalování a léčbě rakoviny a precizní medicíně. Technologie NGS nabízejí perspektivy pro pochopení neidentifikovaných druhů a komplexních syndromů. Metoda NGS je založena na sekvenování, amplifikaci a syntéze. Nejprve dojde k rozdělení DNA na fragmenty, na konce fragmentů jsou dále navázány syntetické oligonukleotidy (tzv. adaptory) o známé sekvenci. Následuje klonální amplifikace těchto fragmentů v tzv. „flow cell“. Jedná se o reakční „komůrku“ s pevně navázanými oligonukleotidy, které zde přebírají roli primeru. DNA fragment je při amplifikaci zdvojen. Následně se původní vlákno odpojí a je v průběhu promývání odmyto, navázán zůstává reverzní řetězec. Dále dojde k přemosťovací amplifikaci (tzv. bridge amplification), nyní jsou tvořena podle reverzních řetězců komplementární vlákna. DNA je takto mnohokrát zreplicována. Následně jsou do směsi přidány nukleotidy s fluorescenční skupinou. Při zařazování nukleotidů za sebou je díky chemické reakci emitováno světlo o určité vlnové délce. Tímto způsobem lze číst pořadí nukleotidů, protože každý typ nukleotidu nese jinou fluorescenční značku (Grada & Weinbrecht 2013).

Pro využití genomických dat je třeba genomická data ve formě krátkých sekvencí písmen vytvořených pomocí NGS nejprve sestavit do sekvence celého genomu. Poté je třeba sekvence porovnat, za účelem zjištění podobnosti a variací, které budou užitečné pro analýzu a nalezení řešení souvisejících se zdravím (Rexie & Raimond 2019).

NGS umožňuje studovat biologické vzorky založené na sekvenčních informacích ve velkém měřítku. DNA je nejdříve purifikována ze vzorků a sekvenování DNA je poté použito k charakterizování asociovaných taxonů s využitím všudypřítomného markerového genu.

Například genu 16S rRNA pro bakterie, genu 18S rRNA pro eukaryota nebo interního transkribovaného spaceru (ITS) DNA přítomného mezi geny rRNA pro houby (Kauter et al. 2019).

## 3.4 Další metody určování genomu

### 3.4.1 Fluorescence in situ hybridizace UNIT (FISH)

Již v roce 1988 (Lichter et al. 1988), byla FISH použita k vizualizaci označených DNA sond hybridizovaných s chromozomy a k vizualizaci buněčných jader v interfázi. Zlepšení klonovaných zdrojů DNA, protilátek, fluorochromů, mikroskopických a zobrazovacích zařízení a softwaru umožnilo mnoho vědeckých výzkumů (Bayani & Squire 2004).

Hybridizační metody byly vyvinuty pro detekci segmentů DNA nebo RNA. Cílem metody FISH je schopnost citlivě snadně zobrazit chromozomy nebo chromozomální oblasti. Užitečné je také počítačové zobrazení, toto zpracování vzorků však není dostupné v každé laboratoři. FISH metoda je využívána pro genetickou analýzu (Swiger & Tucker 1996).

Tato metoda je rozdělena do pěti částí. Tyto části jsou příprava sondy, příprava histologického preparátu - řezu a jeho fixace na sklíčku, hybridizace, posthybridizační promývání a interpretace výsledků. Sondy se připravují pomocí tzv. "nick" translace nebo degenerativní oligonukleotidovou primer PCR (DOP-PCR) za použití haptenu nebo fluorochromem značeného nukleotidu. Množství obsaženého označení haptenu je vyčísleno pomocí tzv. "dot blotting" (Bayani & Squire 2004). Typická délka sondy se pohybuje mezi 250 bp a 1kb, ale záleží na vzorku, pro který sondu potřebujeme (Swiger & Tucker 1996).

FISH metoda se užívá v toxikologii, biodosimetrii, mapování genů, klinické cytogenetice, analýze zárodečných buněk, transgenovém screeningu a v metodě zoo-FISH. ZOO FISH je nejběžnější metoda v identifikaci oblastí homologních chromozómů mezi druhy zvířat (Swiger & Tucker 1996).

### 3.4.2 Makroskopie

Makroskopické hodnocení je jedním z prvních kroků při histopatologickém vyšetření. Makroskopické vyšetření se provádí především kvůli řádnému diagnostickému posouzení. Hledají a porovnávají se možné vzniklé abnormality. U většiny případů se však dává přednost spíše mikroskopickému vyšetření.

Odběr vzorků pro makroskopické vyšetření se provádí tak, že se odebere část z postiženého nebo předpokládaného postiženého orgánu. Bioptický vzorek, čili kousek tkáně je nejprve odříznut a poté dojde ke kompletnímu makroskopickému posouzení. Před makroskopickým vyšetřením je důležité, zjitit celou klinickou historii zvířete a anamnézu, aby nedošlo k chybné interpretaci získaných výsledků. Vzorek pro makroskopické vyšetření se uchovává jen po omezenou dobu a musí být fixován.

Makroskopické posouzení a výběr vhodných bioptických vzorků je rozhodující pro diagnostické posouzení, protože je nepravděpodobné, že by při tomto vyšetření a současném histologickém vyšetření byly přehlédnuty abnormality.



Kompletní záznamy všech potřebných makroskopických informací a odevzdání vzorků dané tkáně při počátečním rozřezání mají větší význam než sběr mikrobiologických dat, která mohou být získána i několik let později. Při vhodném makroskopickém vyšetření je třeba si uvědomit ještě před zahájením řezů do tkáně, všechny důležité klinické informace. Pokud je odebraný vzorek špatně posouzen, stav zvířete se již během vyhodnocování vzorků může výrazně zhoršit nebo zvíře může zahynout (Varma et al. 2020).

### 3.4.3 MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s laserovou asistovanou ionizací s časem průletu matrice (MALDI-TOF MS) způsobila revoluci v identifikaci hub. Dříve byl vyvinut postup extrakce plísni pomocí MALDI-TOF MS. Ačkoli se MALDI-TOF MS stala rutinní metodou v několika laboratořích, obecně dosud není příliš rozšířená (Luethy & Zelazny et al. 2018).

Metoda MALDI-TOF MS se rychle stala základním analytickým nástrojem pro vědy o živé přírodě. Dnes se tato metoda hojně využívá k rutinnímu ověřování identity rekombinantních proteinů, detekci hub a bakterií (Oshikane et al. 2018).

U těchto mikrobiot metoda zkoumá molekulové hmotnosti proteinů, lipidů, nukleotidů, sacharidů a dalších makromolekul (Oshikane et al. 2018; Luethy & Zelazny et al. 2018).

Rychlá identifikace bakterií, jako je matricová laserová desorpční ionizace – hmotnostní spektrometrie doby letu (MALDI-TOF MS), je časově nenáročný a rozšířený přehled o kultivovatelných bakteriálních složkách zkoumaného vzorku (Kauter et al. 2019).

MALDI-TOF MS metoda umožňuje oddělit od sebe molekuly. Slouží k identifikaci peptidů, lipidů, nukleotidů, sacharidů a dalších organických makromolekul. Tato metoda zahrnuje 3 kroky: ionizaci vzorku, analýzu a detekci iontů nebo molekul. Ionizace probíhá za pomoci ionizačního elektrospreje nebo za pomoci matrixového laseru (Oshikane et al. 2018).

K detekci rekombinantních proteinů se využívají tzv. "mixed crystals", které se skládají ze zkoumaného proteinu a matrice. Matrice slouží jako ochrana, která absorbuje laserové záření a převádí je na zkoumané molekuly, které se následně rozpojí a je možné je identifikovat. Před začátkem této metody musí nejdříve proběhnout vyčištění vzorku. Vyčištění proběhne například pomocí testu PCR, poté následuje kultivace vzorku a další čištění. Vyčištěný vzorek je zcentrifugován a supernatant je poté odstraněn. Zbylá sraženina je nanášena na desku a nechá se vyschnout. Při MALDI-TOF metodě se směsný roztok vzorku, matrice nanáší na vzorkovou destičku. Roztok se zcela vysuší a vzniknou směsné krystaly (Oshikane et al. 2018).

## 3.5 Kultivační metody

Podrobné určení mikrobiálního složení střevní mikrobioty v souvislosti se zdravím a nemocemi jsou v 21. století velkou výzvou. V poslední době se obnovil zájem o kultivační metody pro druhy, které dříve nebylo možné kultivovat. Nevýhodou kultivace je časová

náročnost metody a nutnost udržovat specifické podmínky pro rozvoj kultivovaných druhů bakterií (Lagier et al. 2012).

Kultivační metody zahrnují kultivace čistých mikrobiálních kultur na médiu. Používají se tuhnutí složky, jako je želatina nebo agar, aby bylo možné vzorek s bakteriálními koloniemi pozorovat na pevném kultivačním médiu (Lagier et al. 2015). Do média se přidávají přísady, které umožňují nebo zastavují růst jiných druhů bakterií, nebo usnadňují izolaci žádoucích bakteriálních druhů. Důležité je udržování požadovaných podmínek pro růst a vývoj bakterií, např. udržování aerobního nebo anaerobního prostředí (Abdallah et al. 2017).

Jednu z překážek tradičních bakteriologických kultivačních metod se v poslední době podařilo překonat díky rozvoji technologií hmotnostní spektrometrie (MS), které umožňují přesnou a rychlou identifikaci mikroorganismů pomocí ionizace s asistovanou laserovou desorpčí na matici v čase letu (MALDI-TOF), což umožňuje rychlý screening velkého počtu kolonií. Kultivační metody se tedy využívaly více v minulosti a v dnešní době je nahradili spíše metody MALDI-TOF (Lagier et al. 2012).

### **3.5.1 Kultivační analýza (culturomics)**

Kulturomika byla poprvé vyvinuta v roce 2012 a je založená na diverzifikaci kultivačních podmínek. Snaží se co nejvíce napodobit přirozené prostředí, kde bakterie žijí a umožnit izolaci mnoha bakteriálních druhů (Abdallah et al. 2017).

Zájem o studium střevní mikrobioty se znovu oživil s nástupem molekulárních technik, zejména metagenomiky. Kulturomika je vysoce výkonná mikrobiální kultivace s identifikací kolonií pomocí MALDI-TOF MS (Traoré et al. 2020). Kulturomika se využívá v lékařské mikrobiologii, kde se provádí izolace a růst mikroorganismů. Ty jsou důležité pro diagnostiku onemocnění a stanovení účinné léčby (Abdallah et al. 2017).

Bakteriální kultura je důležitá při hodnocení citlivosti a virulenci na antibiotika. Kvůli kulturomice jsou možné studie genomu (Singh et al. 2013; Lagier et al. 2015). Aby se mohli měnit různé požadavky na růst bakterií, musí se měnit čtyři základní parametry, a to jsou: výběr živin, atmosféra, teplota, inkubační doba (Lagier et al. 2015; Abdallah et al. 2017).

V dřívější době byla kulturomika velice časově náročná a měla mnoho kultivačních podmínek. Postupem času byla kultivace zdokonalována, počet kultivačních podmínek se snížil a došlo k zavedení tří základních kroků. Tři základní kroky jsou izolace maximálního počtu mikroorganismů, předinkubace a systematická detekce mikrokolonií pěstovaných na médiu (Lagier et al. 2015). Tyto kroky vedly ke snížení pracovní zátěže a rozšíření kapacity testování vzorků bakterií (Abdallah et al. 2017).

V dnešní době má kulturomika tu výhodu, že společně s metodami rychlé identifikace bakterií jako je metoda MALDI-TOF MS je možný rychlý přehled a výzkum kultivovatelných bakteriálních složek ze zkoumaného vzorku (Kauter et al. 2019).

Kulturomika v dnešní době je více efektivní než dříve. Není tolik časově ani pracově náročná, dokáže detekovat a vyizolovat více bakteriálních druhů, než dříve a to kvůli moderním nástrojům, umožňujícím správnou charakterizaci a taxonomickou klasifikaci. Tato metoda znásobila taxonomickou klasifikaci o bakteriích, jak známých, tak i doposud nezařazených, které byly dříve detekovány metagenomikou, ale nezařazeny, kvůli nedostatku izolátu potřebnému k dokončení zařazení (Abdallah et al. 2017).

## 4 Mikrobiota jednotlivých částí trávicího traktu koní

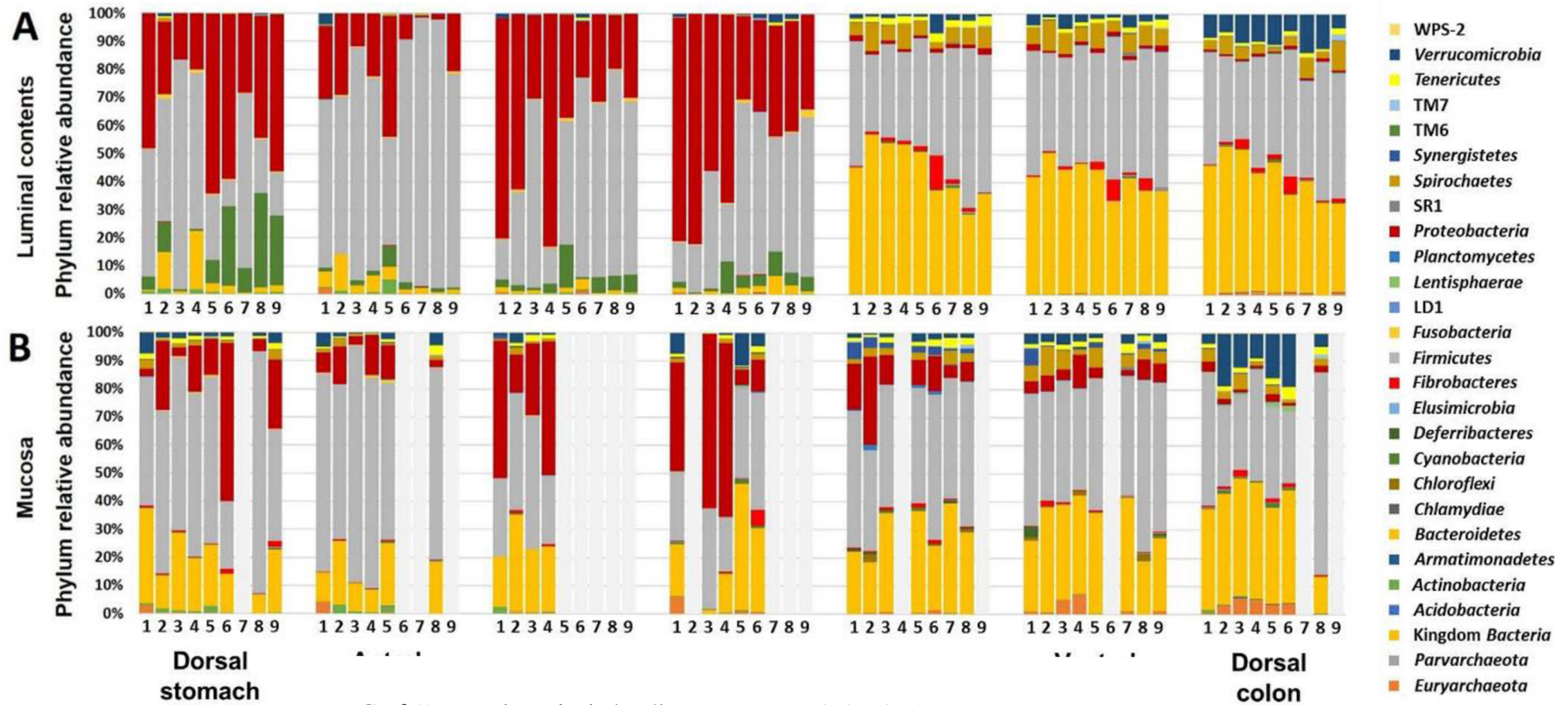
Koňský trávicí trakt je jedinečný systém, který lze v dnešní době vyšetřit mnoha metodami. Vyšetření nejsou však stále zcela podrobná a potřebují řadu vylepšení. Kůň je nepřežvýkavý býložravec a má trávicí trakt závislý především na aktivitě tlustého a slepého střeva. V slepém a tlustém střevě probíhá největší produkce mastných kyselin pomocí metabolismu fibrolytických bakterií, tedy zejména acetátu, propionátu nebo butyrátu (Park et al. 2021). Fibrolytické bakterie v trávicím traktu koně pomáhají rozkládat celulózu. Proto jsou mikrobiota trávicího traktu tolik důležitá, protože kůň je potřejuje, aby správně strávil potravu, kterou přijal. Tyto bakterie tedy vyrábí energii, kterou poté kůň využívá (Perkins et al. 2012).

Zastoupení mikrobiot v jednotlivých částech trávicího traktu je obrovské a je proto těžké detekovat veškerá gastrointestinální mikrobiota koní. I když již bylo vyvinuto mnoho metod na prouzkoumání mikrobiot v trávicím traktu koní, zatím není možné určit veškerá mikrobiota danými metodami, jelikož není dostatek studií na průzkum trávicího traktu koní, protože je buď málo kanylovaných koní nebo se koně musejí pro daný výzkum usmrtit (Perkins et al. 2012).

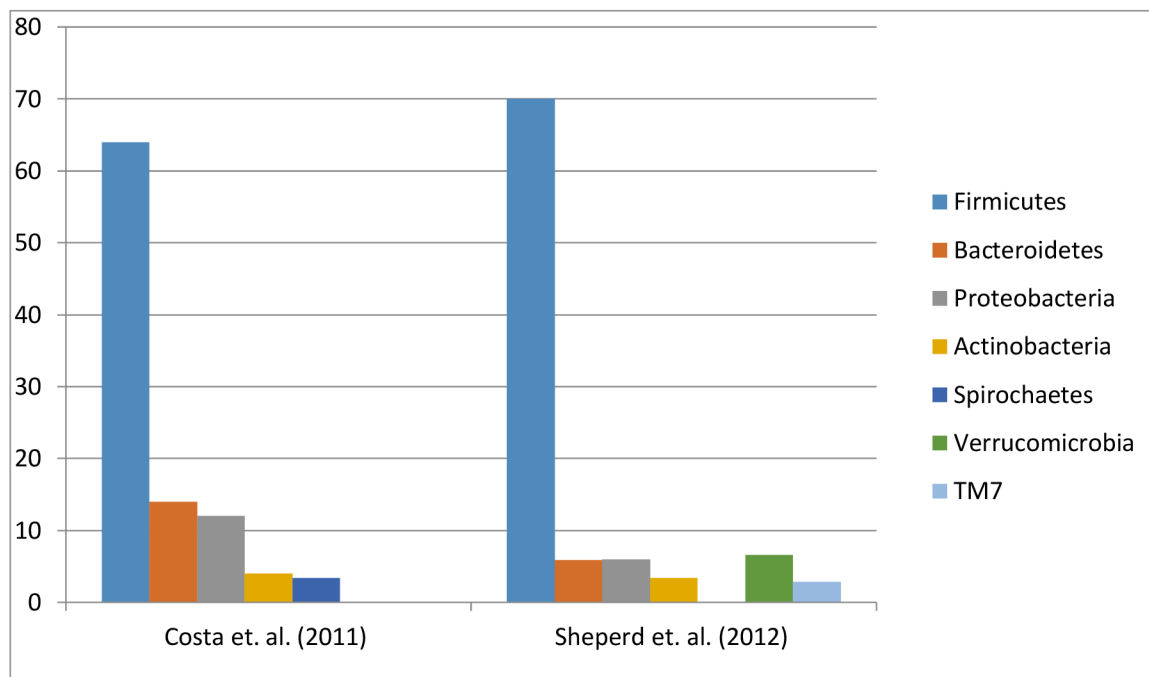
Většina autorů uvádí odlišné hodnoty četnosti bakterií v trávicím traktu koní. Rozdílné výsledky uvádí například autoři Costa et al. (2011) a Sheperd et al. (2012) u bakteriálních kmenů *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, bakterie TM7 (graf č. 2).

*Fibrobacteres* je fibrolytický kmen bakterií. Kmen je běžně hojný a téměř nejobvyklejší ve střevní mikrobiotě koní. Ale i tak někteří autoři jako je Shepherd et al. (2012), Costa et al. (2012) nebo Daly et al. (2012) uvádí nízký výskyt tohoto bakteriálního kmene a proto není hojnost tohoto kmene zcela jasná (Zhu et al. 2021).

Bakterie v jednotlivých částech trávicího traktu koní konkrétně v dorzální a antrální části žaludku, lačnicku, kyčelníku, slepém střevě, vetnrálním a dorzálním tračnicku popisují autoři Ericsson et al. (2016)(graf č. 1).



Graf č. 1: zobrazuje jednotlivá zastoupení bakterií, která byla detekována Ericssonem et al. (2016) dle vyšetření lumina a hlenu v žaludku, lačníku, kyčelníku, slepém střevě, vzestupném a sestupném tračníku u 9 zdravých koní. Vzorky byly odebírány posmrtně.



Graf č. 2: Zastoupení bakterií se liší u jednotlivých autorů. Různá četnost umístění jednotlivých kmenů bakterií v trávicím traktu koní je dle autorů Costa et al. (2011) *Firmicutes* (64 %), *Bacteroidetes* (14 %), *Proteobacteria* (12 %), *Actinobacteria* (4 %), *Spirochaetes* (3,4 %), *Verrucomicrobia* (0 %), bakterie *TM7* (0 %) a dle autorů Sheperd et al. (2012) *Firmicutes* (70 %), *Bacteroidetes* (5,9 %), *Proteobacteria* (6 %), *Actinobacteria* (3,4 %), *Spirochaetes* (0 %), *Verrucomicrobia* (6,6 %), bakterie *TM7* (2,9 %).

## 4.1 Mikrobiota v žaludku koní

Mikrobiom žaludku koní je velice pestrý. Mikroorganismy žaludku koní tvoří bakterie. Další mikrobiota jako jsou houby, prvoci a viry nebyly zatím u zdravých koní v žaludku nalezeny. Studie žaludečního mikrobiomu slouží například k posouzení změn mezi glandulární žaludeční sliznicí a mikrobiomem žaludeční tekutiny. Některé změny mezi mikrobiomem žaludeční tekutiny a glandulární žaludeční sliznicí může mít vliv na tvorbu žaludečních vředů (Paul et al. 2021)

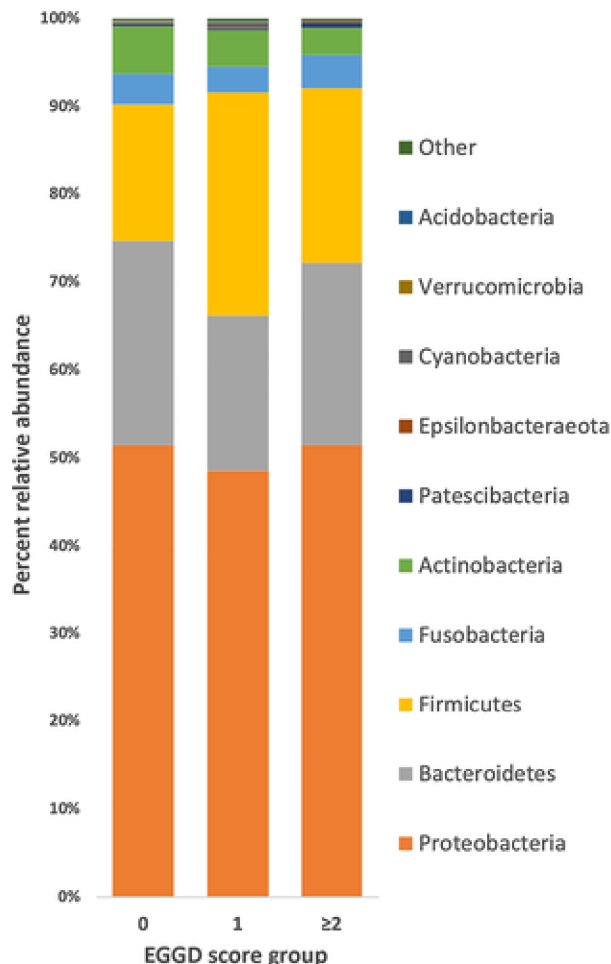
### 4.1.1 Bakterie v žaludku

Metodou fluorescentní hybridizace in situ byly v žaludku koní objeveny bakterie jako je například rod *Streptococcus*, který zahrnuje druhy *Streptococcus* spp. (Perkins et al. 2012), *Streptococcus lutetiensis* a *Streptococcus bovis / equinus* (Milinovich et al. 2007). Dále byl v žaludku popsán i druh *Escherichia coli* (Milinovich et al. 2008). Tato metoda se využívá spíše k vyhledávání konkrétních skupin, ale ne k vyšetření celého mikrobiomu (Milinovich et al. 2007).

Paul et al. (2021) popsali nejvíce zastoupené bakteriální kmeny odebrané ze slizniční stěny žaludku koní. Tyto kmeny jsou: *Proteobacteria* (50%), *Bacteroidetes* (21%), *Firmicutes* (20%) a bakteriální rody *Actinobacillus* (17%), *Moraxella* (10%), *Porphyromonas* (9%).

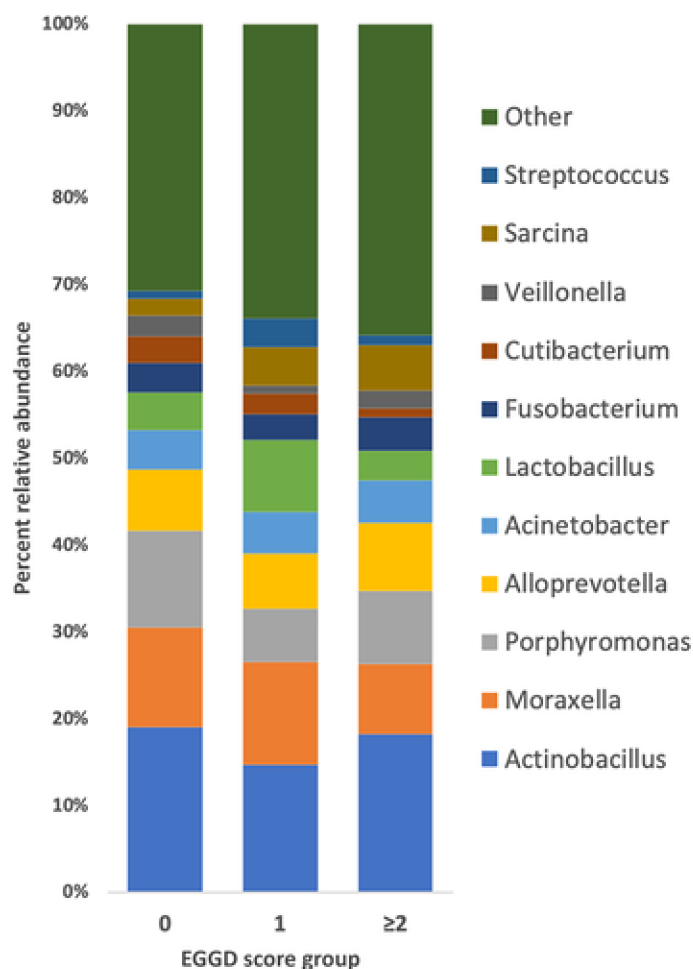
Dále popsali nejvíce obsažené bakteriální kmeny z žaludeční tekutiny v žaludku koní: *Proteobacteria* (39%), *Firmicutes* (28%), *Bacteroidetes* (19%) a bakteriální rody *Actinobacillus* (13%), *Lactobacillus* (8%), *Alloprevotella* (7%). Tyto mikroorganismy byly gastrokopicky odebírány z trávicí tekutiny a bioptických vzorků (graf č. 3, graf č. 4)(Paul et al. 2021)

Byly odebrány i vzorky z dlaždicové, žláznové a antrální oblasti žaludku. A na základě těchto odběrů byly objeveny bakterie rodu *Lactobacillus spp.*, *Moraxella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Sarcina spp.*, *Eubacterium spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Veloinella spp.* (Perkins et al. 2012). Ve studii Perkins et al. (2012) se zjistilo, že kmeny bakterií *Firmicutes* a například kmen *Proteobacteria* mají pozitivní vliv na trávicí trakt koní. Ale přemnožené rody bakterií *Streptococcus* a *Lactobacillus* působí na trávicí trakt negativně. U některých koní v této studii s přemnoženými bakteriemi rodu *Lactobacillus* a *Streptococcus*, byly nalezeny žaludeční vředy a tyto rozdíly mezi zdravými a nemocnými koňmi mohly být způsobeny, jednak rozdílnou stravou, ustájením, cvičením nebo 12 hodinovou hladovkou (Perkins et al. 2012).



Graf č. 3: skládaný sloupcový graf, který popisuje dle Paula et al. (2021) hlavní kmeny bakterií detekovaných ve vzorcích biopsie ze žaludeční sliznice u koní bez EGGD (EGGD je žláznové onemocnění žaludku). graf číslo 0 zobrazuje koně bez EGGD, číslo 1 je graf, který

označuje středně závažné postižení žaludečními vředy a graf číslo 2 označuje nejzávažnější onemocnění žaludečními vředy.



Graf č. 4: graf zobrazuje skládaný sloupcový graf, který ukazuje hlavní rody bakterií detekované ve vzorcích biopsie žaludeční sliznice u koní bez EGGD (sloupec 0), ( sloupec 1) se středně závažným projevem EGGD, s nejzávažněji poškozenou sliznicí (sloupec 2) EGGD, Paul et al. (2021).

## 4.2 Mikrobiota v tenkém střevě

Mikrobiota tenkého střeva se liší u každého koně i u každého výzkumu. Složení vnitřního lumenálního obsahu střeva se výrazně mění u přechodu mezi tenkým a tlustým střevem. Výrazná variabilita byla také zjištěna ve vzorcích žaludku a tenkého střeva v porovnání se vzorky slepého a tlustého střeva. Zajímavostí je, že v této studii byly mnohem menší rozdíly ve složení mikrobiot mezi horním a dolním GIT ve vzorcích sliznic. Výjimkou byly sinice, všechny ostatní kmeny bakterií byly detekovány na sliznicích všech anatomických struktur (Ericsson et al. 2016). Složení mikrobiální komunity v horní části GIT, což zahrnuje žaludek, jejunum a ileum, bylo velmi různorodé mezi koňmi i mezi oblastmi v rámci jednoho koně. Výskyt prvoků, hub a virů v trávicím traktu koní nebyl zatím prokázán. (Ericsson et al. 2016).



#### 4.2.1 Bakterie tenkého střeva

Obecně lze říci, že množství a diverzita bakterií jsou mnohem vyšší v tlustém střevě než v žaludku a tenkém střevě. Výjimkou jsou proteobakterie, které jsou dominantní v ileu, zatímco v tlustém střevě jsou dominantní a hojné kmeny bakterií *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (Dougal et al. 2013; Abreu & Taga 2016; Liu et al. 2019; Felipe et al. 2022).

Ale například dle Ericssona et al. (2016) jsou dominantními kmeny bakterie v tenkém střevě *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. I přesto v této oblasti bylo u všech koní detekováno mnoho stejných dominantních taxonů, jako jsou například rody *Actinobacillus spp.* a *Lactobacillus spp.*, četnost těchto bakterií se však mezi jednotlivými vzorky lišila. Tato různorodost pravděpodobně souvisí s relativně vysokou průchodností v horní části GIT, čímž je podpořeno neustálé zavádění environmentálních bakterií, které jsou přítomny v krmivu a píci (Ericsson et al. 2016).

Běžnou mikrobiotu v ileu definují především bakterie čeledi *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Pasteurellaceae* a *Actinobacillus spp.* Rod bakterie *Actinobacillus spp.* se mohou stát i nejhojnějšími taxony v ileu. *Actinobacillus spp.* je součástí mikrobioty ilea i u zdravých prasat a lidí. Tato bakterie může vykazovat protizánětlivé vlastnosti, ale může zároveň být potenciálním patogenem (Durand et al. 2022).

Rod *Streptococcus spp.* zahrnuje některé bakterie produkující kyselinu mléčnou a je převážně spojován se zdravým mikrobiomem tlustého střeva koně, jelikož během evoluce ztratil některé virulentní faktory. Zároveň je ale tento rod spojován s rozvojem některých onemocnění jako je například laminitida spojená s překrmením jednoduchými sacharidy (Zhu et al. 2021).

#### 4.3 Mikrobiota v tlustém a slepém střevě

Koně (*Equus caballus*) fermentují potravu v tlustém střevě, které je osídleno komplexem mikrobiot. Většinou jsou zde zastoupena anaerobní mikrobiota, která usnadňují trávení potravy s vysokým obsahem vlákniny. Střevní mikrobiom také ovlivňuje imunitní systém koně a metabolismus a pomáhá při detoxikaci škodlivých látek v těle zvířete. Střevní mikrobiom koní je velmi složitá komunita, kterou je možné upravit dietou. Narušení střevní mikroflóry koní může mít zásadní dopad na celkové zdraví zvířete. Změny v přirozené stravě spojené s domestikací ovlivnily různé tělesné funkce koní. Tyto evoluční změny způsobily zdravotní problémy, které jsou: kolika, laminitida a další dysfunkce. Změny spojené s domestikací vedou ke změnám pH tlustého střeva a fermentovaných produktů a některé z těchto změn mohou u koně vyvolat koliku (Zhu et al. 2021).

Trávicí trakt koní funguje na principu zpracování ve slepém a tlustém střevě (Frape 2010).

Tlusté střevo obsahuje bakterie, anaerobní houby, metanogenická archaea a prvoky. V tlustém střevě se u zdravého koně nenacházejí viry. Z těchto mikrobiot jsou nejdůležitější

anaerobní houby, která rozkládají rostlinná vlákna, za pomoci enzymů degradujících vlákninu (Gruninger et al. 2014; Haitjema et al. 2014).

### 4.3.1 Bakterie tlustého a slepého střeva

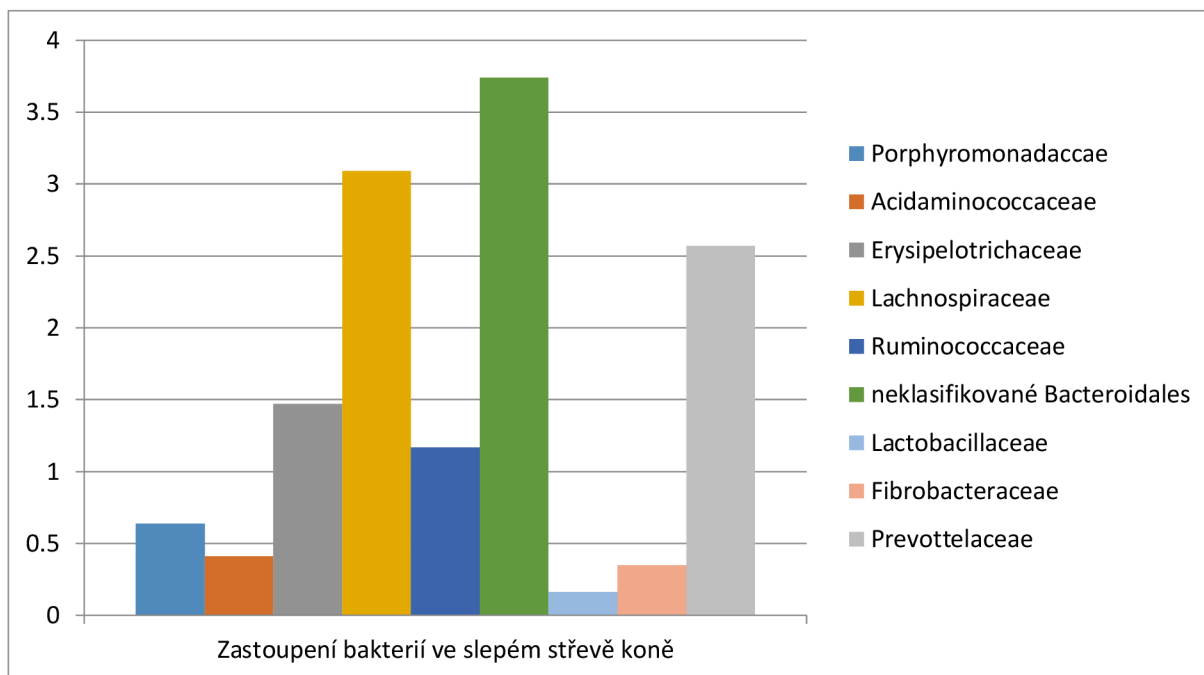
Studie mikrobiot tlustého střeva koní dle Dougal et al. (2013), Moreau et al. (2014), Costa et al. (2015), Hansen et al. (2015) objevily bakterie ve střevech koní. Autoři studií tlustého střeva koní uvádějí nejvyšší zastoupení bakteriálních kmenů *Firmicutes* (20-59 %) a *Bacteroidetes* (2-65 %), které se nejčastěji nacházejí ve slepém střevě a ventrálním tračníku. Dále autoři v lumenu slepého a tlustého střeva popisují kmeny *Proteobacteria* (0-14%), *Verrucomicrobia* (0-24%), *Spirochaetes* (1-9%), *Fibrobacteres* (1-7 %) a *Actinobacteria* (0-2%).

Zastoupení jednotlivých bakterií v tlustém střevě se ale liší studií od studie. Například Kauter et al. (2019) uvádí zastoupení kmene *Firmicutes* mezi 40-90%. Tento kmen zahrnuje rody bakterií *Clostridium spp.* a *Bacillus spp.*. Tyto bakterie se zdají být součástí střevního mikrobiomu, lumenu slepého střeva a tlustého střeva, a produkují butyrát jako ochrannou vrstvu pro kolonocyty (epitelové buňky tlustého střeva). V menší míře jsou v tlustém střevě čeledi bakterií *Ruminococcaceae* a *Fibrobacteraceae*, které pomáhají degradovat rostlinná vlákna. *Proteobacteria* je kmen gramnegativních bakterií, v ileu je jejich zastoupení přibližně okolo 33 %. Zahrnuje čeledi *Enterobacteriales*, *Pseudomonadaceae*, *Pasteurellaceae*. Mají mnoho funkcí a spousta z nich není zcela známá. Jednou ze známých funkcí je fixace střevního dusíku. Při zvýšeném zastoupení těchto bakterií v GIT koně může dojít k zánětlivým procesům nebo kolikám koní (Kauter et al. 2019).

Dalšími bakteriálními kmeny jsou *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* a *Chlamydiae*, které se zkoumají na základě sekvence genu 16S rRNA. Nachází se ve slepém střevě, malém tračníku a konečniku. *Verrucomicrobia* pomáhá udržovat integritu mucinové vrstvy a snižují riziko zánětu střev (Kauter et al. 2019).

Autoři Dougal et al. (2013) a Julliand & Grimm (2016) ve studii uvádí, že ve slepém střevě koní jsou nejvíce zastoupené čeledi bakterií *Prevotellaceae*, *Fibrocteraceae*, *Lactobacillaceae*, neklasifikované *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Porphyromonadaceae* (graf č. 6).

Čeď *Lachnospiraceae* se skládá z velkého shluku fibrolytických a sacharolytických bakterií jako je rod *Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Eubacterium spp.* (Zhu et al. 2021).



Graf č. 5: sloupcový skládaný graf, který zobrazuje jednotlivé procentuální zastoupení bakteriálních čeledí a jejich místa nálezu ve slepém střevě, sestavený z dat sesbíraných ze dvou studií, a to dle Dougal et al. (2013) a Julliand & Grimm (2016).

#### 4.3.2 Houby tlustého střeva a slepého střeva

Anaerobní houby jsou fibrolytické mikroby v tlustém střevě koní. Frappe (2010) provedl studii hub a zkoumal šest částí trávicího traktu koní: slepé střevo, pravý ventrální tračník, levý ventrální tračník, pravý dorzální tračník, levý dorzální tračník a konečník.

Tlusté střevo je osídleno bakteriemi, anaerobními houbami, metanogenními archea a prvoky. Z těchto všech mikroorganismů, pomáhají při rozkladu vlákniny především anaerobní houby (*Neocallimastigomyces*). Jinak řečeno anaerobní houby pomáhají sadě enzymů degradovat stěnu rostlinných buněk (Gruninger et al. 2014; Haitjema et al. 2014). Tyto houby jsou přítomny u koní v zadních částech střev už pár týdnů po narození (Julliand et al. 1996), navzdory tomu jsou současné poznatky o anaerobních houbách získány ze studií na přežvýkavcích. Rody anaerobních hub, které byly dosud popsány, jsou vláknité monocentrické (*Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyces*, *Buwchfawromyces*), polycentrické (*Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Pecoramycetes*) a baňaté houby (*Caecomycetes*, *Cyllamyces*) (Gruninger et al. 2014; Edwards et al. 2017). Tyto rody byly rozšířeny v roce studie Mura et al. (2019) o nové monocentrické rody *Feramyces* (Hanafy et al. 2018) a *Liebetanzomyces* (Joshi et al. 2018; Mura et al. 2019).

V roce 1930 byl identifikován rod *Callimastix* jako protozoální organismus (Hsiung et al. 1930), později byl znovu prozkoumán a přejmenován na druh *Neocallimastix equi* (Vavra & Joyon 1966).

V roce 1961 byla objevena existence druhu houby *Geotrichum candidum* (Batista et al. 1961). Druh houby *Piromyces equi* byl vyizolován ze slepého střeva koně (Orpin 1981; Munn 1994). *Piromyces citronii* byl vyizolován ze slepého střeva poníka (Gaillard-Martinie et al. 1995; Julliand et al. 1998). Druh houby *Caecomyces equi* vyizoloval Gold et al. (1988) ze slepého střeva koně.

Mura et al. (2019) objevil geny těchto hub rodu *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Piromyces*, *Buwchfawromyces*, *Feramyces*, *Neocallimastix*, *Pecoramyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Liebetanzomyces*, *Oontomyces*.

*Neocallimastix*, známý pro své vynikající hydrolytické vlastnosti a multifunkční celulozomální enzymy, byl objeven v pravém ventrálním kolonu a rektu. Předpokládá se, že tento rod dokáže velice účinně degradovat hemicelulózu či celulózu (Gruninger et al. 2014; Wei et al. 2016).

Charakteristika hub koňského tlustého střeva potřebuje mnoho dalších posouzení a prozkoumání (Julliand et al. 2016).

### 4.3.3 Prvoci (Protozoa) tlustého a slepého střeva

Další částí mikrobioty tlustého a slepého střeva jsou prvoci. Mezi nejpočetnější rody prvoků patří *Blepharocorys* a *Cycloposthium*, kteří jsou nejvíce zastoupeni ve slepém střevě a v tračníku (Hsiung et al. 1930; Kern et al. 1973; Bonhomme-Florentin et al. 1985; Goodson et al. 1988; Mura et al. 2019).

Hsiung (1930) popsal 4 třídy prvoků. *Rhizopoda*, *Mastigophora*, *Ciliata*, *Suctorina*, které se vyskytují ve slepém střevě a tračníku. Objevil také výskyt všech *Ciliat* (Ciliata oligotrichs), kromě rodu *Cycloposthium* (Julliand and Grimm 2016).

## 4.4 Mikrobiota v konečniku

Studíí na mikroorganismy konečniku koní není mnoho. Mikrobiota v konečniku jsou především bakterie a houby. V konečniku nejsou zastoupeni prvoci a viry.

### 4.4.1 Bakterie konečniku

Mezi mikrobiota konečniku patří bakteriální kmeny *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* a *Chlamydiae*, které byly objeveny pomocí analýzy sekvence genu 16S rRNA. *Verrucomicrobia* navíc pomáhá udržovat integritu mucinové vrstvy a snižuje vznik zánětu (Kauter et al. 2019).

#### 4.4.2 Houby v konečniku

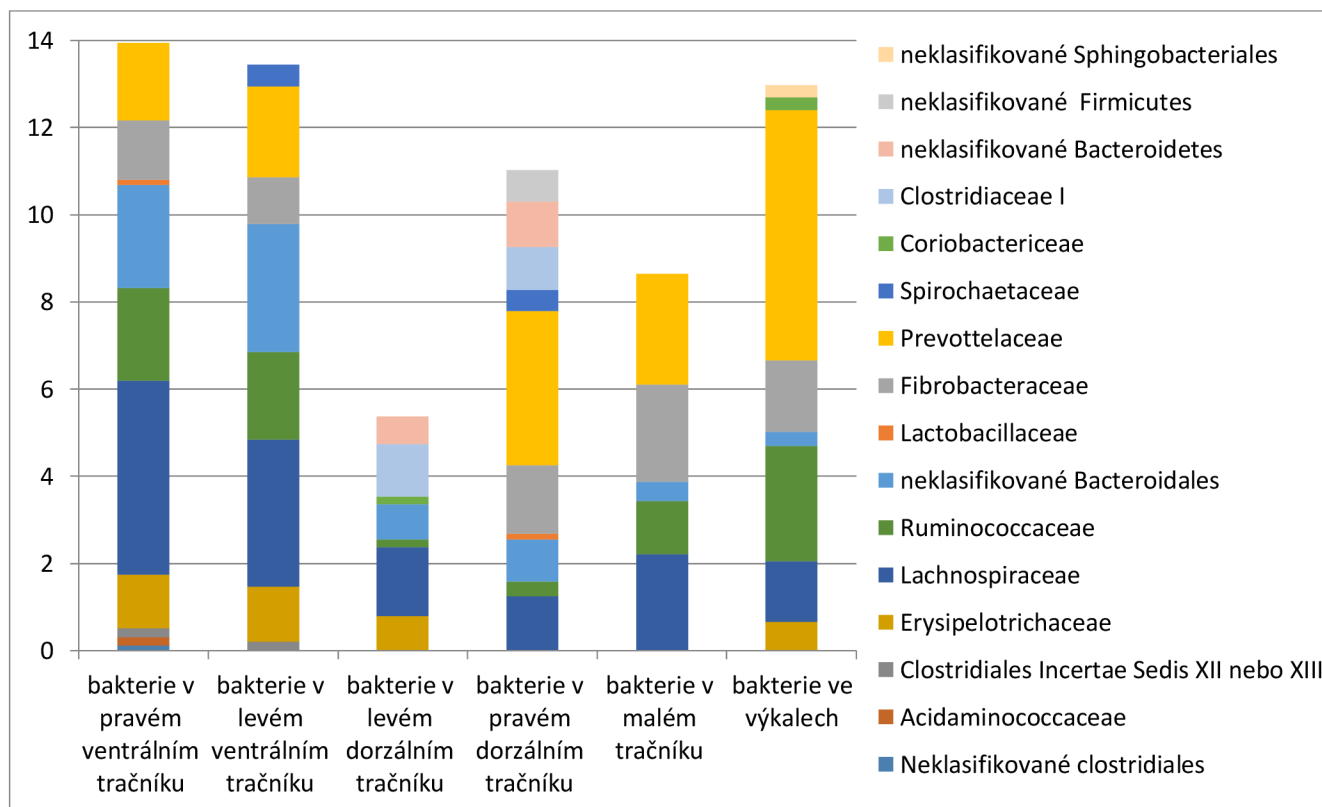
V konečniku lze nalézt téměř všechny houby, které jsou přítomny v proximálních částech tlustého střeva, jelikož velká část z nich putuje do konečniku a ven spolu s tráveninou při defekaci (Grüninger et al. 2014; Wei et al. 2016).

#### 4.5 Mikrobiota ve výkalech koní a poníků

Provádění studií na mikrobiota ve výkalech je nejvíce rozšířené a to pravděpodobně proto, že odběr vzorků je nejjednodušší. Odběratel nemusí zasahovat příliš do denního režimu zvířete, tudíž odběr vzorků není pro zvíře tolik stresující (Theelen et al. 2021). Vzorky výkalů jsou odebírány ihned po defekaci, nebo přímo z konečniku, než fekálie dopadne na zem, kde může být kontaminována.

Mikrobiota odebraná z fekálií se používají ke studii vlivu potravy na střevní mikrobiota koní (Zhu et al. 2020).

Autoři Dougal et al. (2013) a Jullian & Grimm (2016) objevili v tlustém střevě a výkalech koní největší počet těchto čeledí bakterií *Coriobacteriaceae* (0,29 %), *Fibrobacteraceae* (1,65 %), *Ruminococcaceae* (2,64 %), *Lachnospiraceae* (1,39 %), *Erysipelotrichaceae* (0,66 %) a další (graf č. 6).



Graf č. 6: sloupcový skládaný graf, který zobrazuje jednotlivé zastoupení bakteriálních čeledí a v jednotlivých úsecích tlustého střeva a ve výkalech (%). Data byla seskupena ze dvou studií, Dougal et al. (2013), Jullian & Grimm (2016).

#### 4.5.1 Bakterie ve výkalech koní

Výzkum vlivu zdraví trávicího traktu na zdravotní kondici koně byl proveden již mnohokrát. Výzkumů, které by porovnávaly mikrobiota trávicího traktu zdravého koně a mikrobiota koně s onemocněním trávicího traktu ale zatím není mnoho (Park et al. 2021).

Mezi hlavní kmeny bakterií, které se vyskytují ve výkalech koní, patří *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* a *Chlamydiae*. Tyto bakteriální kmeny jsou obsaženy ve výkalech zhruba z 10 - 23 %. Pomáhají udržovat integritu mucinové vrstvy a snižují incidenci zánětu střev (Kauter et al. 2019).

Autoři Theelen et al. (2021) objevili v jejich výzkumu u koní, že nejvíce zastoupenými kmeny bakterií ve výkalech jsou kmeny *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Fibrobacteres*, *Cyanobacteria* (graf č. 7).

Autoři Costa et al. (2012) objevili rody bakterií ve výkalech koní. Tyto rody jsou *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Pomocí genového klonování a sekvenování byly objeveny druhy *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus equinus*, *L. mucosae*, *L. salivarius* (Willing et al. 2009), (Costa et al. 2012). Tyto bakterie mohou znamenat, že jsou koně překrmováni vysokým množstvím jednoduchých sacharidů a škrobu v krmné dávce. Když dojde k přetížení sacharidy, narůstá počet laktobacilů a klesá počet gramnegativních bakterií, což u koní může znamenat nástup laminitidy. Zvýšený nález rodu *Streptococců* a *Lactobacilů* ve výkalech značí u koní onemocnění (Costa et al. 2012).

Ve studii Park et al. (2021) se prováděl výzkum fekálních mikrobiot u koní. Tento výzkum byl proveden za účelem stanovení rozdílů mezi koňským mikrobiomem zdravých a nemocných koní. Byly odebrány vzorky výkalů koní s kolikou tlustého střeva, s kolikou tenkého střeva a vzorky výkalů od zdravých koní. Vzorky výkalů byly odebrány přímo z rekta čistou rukavicí, aby nedošlo ke kontaminaci z prostředí. Posouzení vzorků na mikroby trávicího traktu koní se provedlo metodou sekvenace DNA a vzorky byly připraveny extrakcí DNA z fekálií.

Celkově druhová rovnoměrnost bakterií u koní s kolikou byla výrazně nižší než u zdravých koní. Největší zastoupení měly kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Kmen *Firmicutes* se vyskytoval ve větší míře u koní s kolikou tenkého střeva (Park et al. 2021).

*Firmicutes* je hlavním bakteriálním kmenem objeveným u většiny studií ve fekálních mikrobiotech nalezený u zdravých koní (Costa et al. 2012; Weese et al. 2015; Costa et al. 2015; De Almeida et al. 2016; Dougal et al. 2012; Massacci et al. 2019; Donnell et al. 2013; Proudman et al. 2015; Schoster et al. 2015; Shepherd et al. 2012; Costa et al. 2015; Stewart et al. 2018; Biddle et al. 2018; Zhao et al. 2016; Rodriguez et al. 2015).

Relativní hojnost kmene *Bacteroidetes* v těchto studiích se pohybuje v kolem 42 % (Weese et al. 2015; Proudman et al. 2015). Ale jelikož se výsledky každé studie liší, najdou se i studie, kde je hojnost kmene *Bacteroidetes* výrazně nižší. Studie, které měly *Bacteroidetes* v

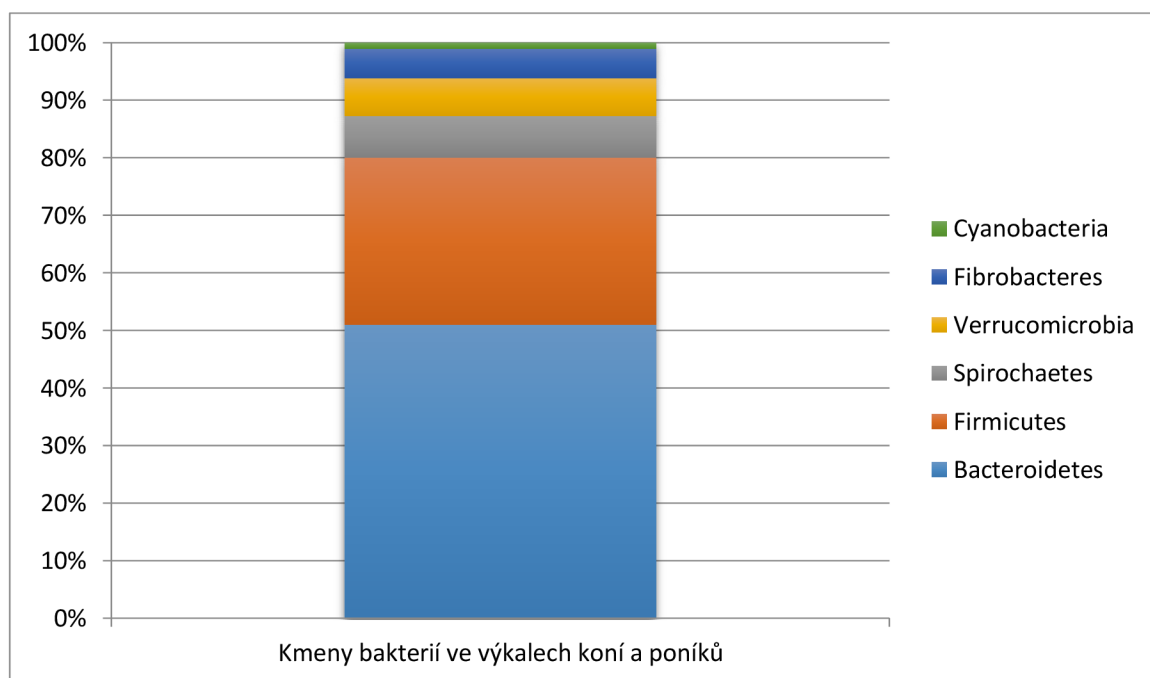
rozsahu 33-52 % (tedy, vyšší hodnoty, v průměru 43 %), jsou podobné studii Theelen et al. (2021), téměř všichni používali při získávání dat stejnou sadu na extrakci DNA.

U koní se střevním onemocněním bylo výrazně zvýšené zastoupení bakteriálního rodu *Enterococcus* a *Acithobacter* v tlustém střevě, ale přítomnost rodu *Methanobrevibacter* byla minimální. U koní s nálezem bakteriálních čeledí dvou bakterií mléčného kvašení *Lachnospiraceae* a *Lactobacillaceae* byly zhoršené střevní obtíže (Park et al. 2021).

Tato studie může podpořit předchozí zjištění, že nadměrná produkce laktátu a pokles lumenálního pH v tlustém střevě jsou spojeny se zvýšeným relativním výskytem bakterií rodu *Streptococcus* a bakterií mléčného kvašení u koní s kolikou (Park et al. 2021).

Ve studii Milinovich et al. (2007) objevili ve výkalech koní různé druhy bakterií rodu *Streptococcus*, *Lactobacillus* a druhu *Escherichia coli*. Koně, u kterých našli tyto bakterie, trpěli laminitidou. Autoři Milinovich et al. (2007) se domnívají, že laminitida mohla být způsobena těmito bakteriemi.

Výsledky těchto výzkumů slouží k pochopení toho, jak koňská mikrobiota souvisí s různými střevními kolikovými poruchami (Park et al. 2021).



Graf č. 7: graf zobrazuje relativní hojnost kmenů bakterií ve fekální mikrobiotě ve výkalech koní a poníků popsané v tomto skládaném sloupcovém grafu. Vzorky byly odebrány od 61 koní a poníků, Theelen et al. (2021).

#### 4.5.2 Viry ve výkalech koní a poníků

Cann et al. (2005) identifikoval čeledi virů *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* a rod *Orthopoxvirus spp.* z výkalů koní, ale dvacet pět procent těchto virů nebylo v té době klasifikováno (Jullian & Grimm 2016).

### 4.5.3 Houby ve výkalech koní

Next generation sequencing (NGS) byla aplikována na výkaly koní a byly objeveny rody hub *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Anaeromyces*, ale spousta z nich je třeba zařadit do nových taxonů, které ještě nebyly popsány (Liggenstoffer et al. 2010). Anaerobní houby hrají roli v degradaci vlákniny v tlustém střevě. U druhu *Piromyces equi* bylo dle Orphina (1981) zjištěno, že je schopen trávit rostlinnou celulózu a hemicelulózu. Harhangi et al. (2003) objevil později, že druh houby *Piromyces equi* obsahovala kódovací oblast pro velkou exoglukanázu. U druhu *Piromyces citronii* izolované ze slepého střeva poníka byla také prokázána velká celulótická aktivita (Jullian et al. 1998).



## 5 Závěr

Práce je zaměřena na obsah mikrobiot v trávicím traktu koní a laboratorní metody, které zkoumají mikrobiota v jednotlivých částech trávicího traktu koní. Mezi novější metody se řadí metoda MALDI-TOF MS, metoda NGS, fluorescence in situ hybridizace UNIT, detekce anaerobních hub. Dříve se hojně používaly metody gastroscopie, makroskopie, kultivační analýza a Sangerovo sekvenování.

Metody, které se zabývají studií trávicího traktu koní, zkoumají mikrobiota koní. Tato mikrobiota jsou bakterie, prvoci, viry, houby. Obecně v trávicím traktu se nachází bakteriální kmeny *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*; dále trávicí trakt obsahuje bakteriální rod *Alloprevotella* a někdy bakteriální rod *Streptococcus*. Dle získaných informací jsou nezanedbatelnějšími bakteriálními rody v žaludku: *Lactobacillus spp.*, *Moraxella spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Veilonella spp.* a bakteriální kmeny *Firmicutes*, *Proteobacteria* (Perkins et al. 2012). Bakteriální kmeny v tenkém střevě obsahují *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a rody *Actinobacillus spp.*, *Lactobacillus* a někdy také bakteriální rod *Streptococcus*.

Bakterie tlustého a slepého střeva jsou velmi podobné jako v tenkém střevě a žaludku. Mezi nejčastější bakteriální kmeny tlustého a slepého střeva spadá *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Actinobacteria*; tlusté a slepé střevo obsahuje bakteriální čeleď *Lactobacillaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Porphyrromonadaceae*. V menší míře se nacházejí v tlustém a slepém střevě bakteriální čeledi *Ruminococcaceae* a *Enterobacteriales*. V konečniku mezi nejčastěji nalezené bakteriální kmeny patří *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* a výjimečně *Chlamydie*. Ve výkalech se objevují většinou bakteriální kmeny z předchozích částí trávicího traktu. Nejčastěji nacházíme ve výkalech bakteriální kmeny *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Fibrobacteres*, *Cyanobacteria* a občas bakteriální rody *Lactobacillus* a *Streptococcus*. V tlustém a slepém střevě, konečniku a výkalech byly nalezeny navíc také některé houby. Tyto houby byly v tlustém a slepém střevě rody *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Buwchfawromyces*, *Feramyces*, *Pecoramyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*. *Neocallimastix* byl nalezen také v konečniku. Ve výkalech objevili houby rodu *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces*, *Orpinomyces*. Ve výkalech mohou být také nalezeny viry jako například čeledi *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* a rod *Orthopoxvirus*. U tlustého a slepého střeva byly nalezeny prvoci rodu *Blepharocorys* a *Cycloposthium*, které se nacházejí nejčastěji.

Dle mého názoru, je třeba provést další studie mikrobiomu koní, především na mikroorganismy v tenkém střevě. Celkově studií na téma mikrobiom GIT koní není tolik, jako například u skotu a také nejsou doposud známa a taxonomicky zařazena všechna mikrobiota. Budoucí studie by se měly především zaměřit na mikrobiota v trávicím traktu obecně, jelikož většina studií provádí výzkum mikrobiomu koní z výkalů, ale výsledky mikrobiot z výkalů nemusí mít stejnou hodnotu, jako výsledky například z žaludku nebo tlustého střeva koní. Je třeba vyzkoušet i novější metody výzkumu mikrobiomu koní jako je například metoda NGS, MALDI-TOF MS nebo fluorescence in situ hybridizace UNIT. Tyto metody nejsou využívány natolik, jako ostatní laboratorní metody a chtělo by je využít u většího množství studií spojených s mikrobiomem trávicího traktu koní.

## 6 Literatura

1. Abdallah RA, Beye M, Diop A, Bakour S, Raoult D, Fournier PF. 2017. The Impact of Culturomics on Taxonomy in Clinical Microbiology. *Journal of Microbiology* **110**: 1327-1337.
2. Abreu NA, Taga ME. 2016. Decoding molecular interactions in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews* **40**: 648–663.
3. Argenzio RA. 1975. Function of the equine large intestine and their interrelationship in disease. *The Cornell Veterinarian* **65**: 303-330.
4. Bayani J, Squire JA. 2004. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Current Protocols in Cell Biology* **23**:1-52.
5. Batista A, Chaves U, Fishman VO, Sylva JO. 1961. Flora micoteca intestinal de equinos e asininos no Recife. *Publition Institutional Micology University Recife* **326**:116.
6. Biddle AS, Tomb JF, Fan Z. 2018. Microbiome and Blood Analyte Differences Point to Community and Metabolic Signatures in Lean and Obese Horses. *Frontiers in Veterinary Science* **5**: 225.
7. Bonhomme-Florentin A. 1985. Attachement des Ciliés du caecum de cheval aux fragments végétaux – Dégradation des chloroplastes – Attachement des bactéries aux Ciliés du caecum. *Reproduction Nutrition Development* **25**:127–139.
8. Cann AJ, Fandrich SE, Heaphy S. 2005. Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes. *Virus Genes* **30**:151–156.
9. Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, Weese JS. 2015. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Veterinary Journal* **205**:74–80.
10. Costa MC, Weese JS. 2012. The equine intestinal microbiome. *Animal Health Research Reviews* **13**: 121 - 128.
11. Costa MC, Weese JS. 2018. Understanding the Instestinal Microbiome in Health and Disease. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* **34**: 1-12.
12. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, Clement T, Toohey-Kurth K. 2020. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **32**:767-775.

13. Coleman MC, Cargile CW, Cohen ND, Goldsby JL, Davidson L, Emanuelli AMCH, Ivanov I, Eades S, Ing N, Chapkin RS. 2020. Non-invasive evaluation of the equine gastrointestinal mucosal transcriptome. PLOS ONE (e0229797) DOI: [10.1371/journal.pone.0229797](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229797).
14. Daly K, Proudman CJ, Duncan SH, Flint HJ, Dyer J, Shirazi-Beechey SP. 2012. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. The British Journal of Nutrition **107**: 989–995.
15. Davidson LA, Nguyen DV, Hokanson RM, Callaway ES, Isett RB, Turner ND, Dougherty ER, Wang N, Lupton JR, Carroll RJ, Chapkin RS. 2004. Cheopreventive *n*-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reprogram Genetic Signatures during Colon Cancer Initiation and Progression in the Rat. Cancer Research **64**: 6797-6804.
16. De Almeida MLM, Feringer WHJ, Carvalho JRG, Rodrigues IM, Jordão LR, Fonseca MG, De Rezende ASC, Neto ADQ, Weese JS, Da Costa MC, Lemos EGDM, Ferraz GDC. 2016. Intense Exercise and Aerobic Conditioning Associated with Chromium or L-Carnitine Supplementation Modified the Fecal Microbiota of Fillies. PLoS ONE (e0167108) DOI: [10.1371/journal.pone.0167108](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167108).
17. Donnell MMO, Harris HMB, Jeffery IB, Claesson MJ, Younge B, Toole PWO, Ross RP. 2013. The Core Faecal Bacterial Microbiome of Irish Thoroughbred racehorses. Letters in Applied Microbiology **57**: 492–501.
18. Dougal K, Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ. 2013. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. PLoS ONE (e77660) DOI: [10.1371/journal.pone.0077660](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077660).
19. Dougal K, Harris PA, Edwards A, Pachebat JA, Blackmore TM, Worgan HJ, Newbold CJ. 2012. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. FEMS Microbiology Ecology **82**: 642–652.
20. Dueñas M, Estrella I, Hernández T. 2004. Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). European Food Research and Technology **219**: 116–123.
21. Durand FCh, Sacy A, Karges K, Apper E. 2022. Gastro-Intestinal Microbiota in Equines and its roles in Health and Disease: The Black Box Opens. Microorganisms **10**: 2517.
22. Edwards JE, Forster RJ, Callaghan TM, Dollhofer V, Dagar SS, Cheng Y, Chang J, Kittelmann S, Fliegerova K, Puniya AK, Henske JK, Gilmore SP, O'Malley MA, Griffith GW, Smidt H. 2017. PCR and Omics Based Techniques to Study the Diversity, Ecology and

Biology of Anaerobic Fungi: Insights, Challenges and Opportunities. *Frontiers in Microbiology* (e1657) DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01657>.

23. Englund PT. 1971. Analysis of Nucleotide Sequences at 3' termini of Duplex Deoxyribonucleic Acid with the Use of the T4 Deoxyribonucleic Acid Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* **246**: 3269–3276.
24. Englund PT. 1972. The 3' Terminal Nucleotide Sequences of T7 DNA. *Journal of Molecular Biology* **66**: 209–224.
25. Ericsson AC, Johnson PJ, Lopes MA, Perry SC, Lanter HR. A. 2016. Microbiological Map of the Healthy Equine Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE* (e0166523) DOI: [10.1371/journal.pone.0166523](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166523).
26. Felipe L, Castro R, Thomson P. 2022. Changes in the gut microbiome and colic in horses: Are they causes or consequences? *Open Veterinary Journal* **12**: 242-249.
27. Franca LT, Carriho E, Kist TBL. 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics* **35**: 169-200.
28. Gaillard-Martinie B, Breton A, Dusser M, Julliard V. 1995. *Piromyces citronii* sp. nov., a strictly anaerobic fungus from the equine caecum: A morphological, metabolic and ultrastructural study. *FEMS Microbiology Letters* **130**: 321–326.
29. Garner HE, Moore JN, Johnson JH, Clark L, Amend JF, Tritschler LG, Coffmann JR, Sprouse RF, Hutcheson DP, Salem CA. 1978. Changes in the Caecal Flora associated with the Onset of Laminitis. *Equine Veterinary Journal* **10**: 249-252.
30. Grada A, Weinbrecht K. 2013. Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of Investigative Dermatology* (e11) DOI: [10.1038/jid.2013.248](https://doi.org/10.1038/jid.2013.248).
31. Glinesky MJ, Smith RM, Spires HR, Davis CL. 1976. Measurement of volatile fatty acid production rate in the cecum of the pony. *Journal of Animal Science*. **42**:1465–1470.
32. Gold JJ, Heath IB, Bauchop T. 1988. Ultrastructural Description of a New Chytrid Genus of *Caecum Anaerobe Caecomycetes Equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the *Neocallimastixaceae*. *Bio Systems* **21**: 403–415.
33. Goodson J, Tyznik WJ, Cline JH, Dehority BA. 1988. Effects of an Abrupt Change from Hay to Concentrate on Microbial Numbers and Physical Environment in the Cecum of the Pony. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1946-1950.
34. Gruninger RJ, Anil K, Puniya AK, Callaghan TM, Edwards JE, Youssef N, Dagar SS, Fliegerova K, Griffith GW, Forster R, Tsang A, McAllister T, Elshahed MS. 2014. Anaerobic

- fungi (*phylum Neocallimastigomycota*): advances in understanding of their taxonomy, life cycle, ecology, role, and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology* **90**: 1-17.
35. Haitjema CH, Solomon KV, Henske JK, Theodorou MK, O'Malley MA. 2014. Anaerobic gut fungi: advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnology and Bioengineering*. **111**: 1471-1482.
  36. Hanafy RA, Elshahed MS, Youssef NH. 2018. *Feromyces austinii*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from rumen and fecal samples of wild Barbary sheep and fallow deer. *Mycologia* **110**: 513-525.
  37. Hansen NCK, Avershina E, Mydland LT, Næsset JA, Austbø D, Moen B, Måge I, Rudi K. 2015. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease* (e27216) DOI: 10.3402/mehd.v26.26191.
  38. Harrington CT, Elaine IL, Matthew TO, Eshleman J R. 2013. Fundamentals of Pyrosequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **137**: 1296-1303.
  39. Harhangi HR, Frelove AC, Ubhayasekera W, Dinther M, Steenbakkens PJ, Akhmanova A, Drift CVD, Jetten MS, Mowbray SL, Gilbert HJ. 2003. *Cel6A*, a major exoglucanase from the cellulosome of the anaerobic fungi *Piromyces sp. E2* and *Piromyces equi*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1628**: 30–39.
  40. Hsiung, T. S. 1930. A monograph of the protozoa of the large intestine of the horse. Iowa State University **4**: 1-142.
  41. Chen F, Ye J, Chio Ch, Liu W, Shi J, Qin W. 2020. A simplified quick microbial genomic DNA extraction via freeze-thawing cycles. *Molecular Biology Reports* **47**: 703-709.
  42. Cheng HR, Jiang N. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters* **28**: 55-59.
  43. Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single step method of RNA isolation by acid - guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty- something years on. *Nature Protocols* **1**: 581-585.
  44. Janabi AHD, Kerkhof LJ, McGuinness LR, Biddle AS, McKeever KH. 2016. Comparison of a modified phenol/chloroform and commercial-kit methods for extracting DNA from fecal material. *Journal of Microbiological Methods* **129**: 14-19.
  45. Julliand V, De Vaux A, Villard V, Richard Y. 1996. Preliminary studies on the bacterial flora of the faeces taken from foals, from birth to twelve weeks. Effect of the oral administration of a commercial colostrum replacer. *Pferdeheilkunde* **12**: 209-212

46. Julliand, V, Riondet CH, Vaux AD, Alcarz G, Fonty G. 1998. Comparison of metabolic activities between *Piromyces citronii*, an equine fungal species, and *Piromyces communis*, a ruminal species. *Animal Feed Science and Technology* **70**: 161–168.
47. Julliand V, Grimm P. 2016. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The Microbiome of the Horse Hindgut: History and Current Knowledge. *Journal of Animal Science* **94**: 2262-2274.
48. Joshi A, Lanjekar VB, Dhakephalkar PK, Callaghan TM, Griffith GW, Dagar SS. 2018. *Liebetanzomyces polymorphus* gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (*Neocallimastigomycota*) isolated from the rumen of a goat. *MycKeys* **40**: 89-110.
49. Kauter A, Epping L, Semmler T, Antao EM, Kannapin D, Stoeckle SD, Gehlen H, Lübke - Becker A, Günther S, Wieler LH, Walther B. 2019. The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. *Animal Microbiome* 1 (e14) DOI: <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0013-3>.
50. Kern DL, Slyter LL, Weaver JM, Leffel EC, Samuelson G. 1973. Pony cecum vs. steer rumen: The effect of oats and hay on the microbial ecosystem. *Journal of Animal Science* **37**: 463-469.
51. Koshy L, Anju AL, Harikrishnan S, Kutty VR, Jissa VT, Kurikesu I, Jayachandran P, Nair JA, Gangaprasad A, Nair GM, Sudhakaran PR. 2017. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays. *Molecular Biology Reports* **44**: 97-108.
52. Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, Scola BL, Raoult D. 2012. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection* **18**: 1185-1193.
53. Lagier JCH, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, Scola BL, Raoult D. 2015. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology Reviews* **28**: 237-264.
54. Lee YK, Kim HW, Liu CL, Lee HK. 2003. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *Journal of Microbiological Methods* **52**: 245 - 250.
55. Liggenstoffer AS, Youseff NH, Couger MB, Elshahed M. 2010. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (*Phylum Neocallimastigomycota*) in ruminant and non-ruminant herbivores. *The ISME Journal* **4**: 1225-1235.

56. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Human Genetics* **80**: 224-234.
57. Luethy PM, Zelazny AM. 2018. Rapid one-step extraction method for the identification for molds using MALDI TOF MS. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **91**: 130-135.
58. Liu G, Bou G, Su S, Xing J, Qu H, Zhang X, Wang X, Zhao Y, Dugarjaviin M. 2019. Microbial diversity within the digestive tract contents of Dezhou donkeys. *PLoS ONE* (e0226186) DOI: . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226186>.
59. Massacci FR, Clark A, Ruet A, Lansade L, Costa M, Mach N. 2019. Inter-breed diversity and temporal dynamics of the faecal microbiota in healthy horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **137**: 103–120.
60. Mura E, Edwards J, Kittelmann S, Kaerger K, Voigt K, Mrázek J, Moniello G, Fliegerova K. 2019. Anaerobic fungal communities differ along the horse digestive tract. *Fungal Biology* **123**: 240 - 246.
61. Milinovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, Croser EL, Jassim RAMAI, Morton JM, Van Eps AW, Pollitt CC. 2007. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environmental Microbiology* **9**: 2090–2100.
62. Milinovich GJ, Burrell PC, Pollitt CC, Klieve AV, Blackball LL, Ouwerkerk D, Woodland E, Trott DJ. 2008. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* **2**:1089–1100.
63. Moreau MM, Eades SC, Reinemeyer CR, Fugaro MN, Onishi JC. 2014. Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. *Veterinary Microbiology* **168**: 436–441.
64. Naczki M, Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1523–1542.
65. Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K, Lindström K. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods* **45**: 155–165.
66. Orpin CG. 1981. Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. *Journal of General Microbiology* **123**: 287–296.
67. Oshikane H, Watabe M, Nakaki T. 2018. A simple and effective method for detecting precipitated proteins in MALDI-TOF MS. *Analytical Biochemistry* **546**: 1-4.

68. Park T, Cheong H, Yoon J, Kim A, Yun Y, Unno T. 2021. Comparison of the Fecal Microbiota of Horses with Intestinal Disease and Their Counterparts. *Veterinary sciences* **8**: 113.
69. Paul LJ, Ericsson A C, Andrews FM, Keowen ML, Yniguez FM, Garza FJr, Banse HE. 2021. Gastric microbiome in horses with and without equine glandular gastric disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **35**: 2458–2464.
70. Perkins GA, den Bakker HC, Burton AJ, Erb HN, McDonough SP, McDonough PL, Parker J, Rosenthal RL, Wiedmann M, Dowd SE, Simpson KW. 2012. Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 2522-2532.
71. Proudman CJ, Hunter JO, Darby AC, Escalona EE, Batty C, Turner C. 2015. Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal* **47**: 580– 586.
72. Rappé MS, Giovannoni SJ. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* **57**: 369–394.
73. Rexie JAM, Raimond K. 2019. Evolution of Methods for NGS Short Read Alignment and Analysis of the NGS Sequences for Medical Applications. *Computer Aided Intervention and Diagnostics in Clinical and Medical Images* **31**: 135-142.
74. Rodriguez C, Taminiou B, Brévers B, Avesani V, Van Broeck J, Leroux A, Gallot M, Bruwier A, Amory H, Delmée M, Daube G. 2015. Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rdna barcoded pyrosequencing, and carriage rate of clostridium difficile at hospital admission. *BMC Microbiology* **15**: 181.
75. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiology Review* **90**: 859–904.
76. Shepherd ML, Swecker WS, Jensen RV, Ponder MA. 2012. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *FEMS Microbiology Letters* **326**: 62–68.
77. Schoster A, Mosing M, Jalali M, Staempfli HR, Weese JS. 2015. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. *Equine Veterinary Journal* **48**: 595–602.
78. Spanton JA, Smith L, Mair TS. 2019. A clinical audit of the prevalence of colic in the 48 hours after gastroscopy in 436 horses. *Equine Veterinary Education* **32**: 12-15.



79. Staley JT, Konopka A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* **39**: 321–346.
80. Stewart HL, Pitta D, Indugu N, Vecchiarelli B, Engiles JB, Southwood LL. 2018. Characterization of the fecal microbiota of healthy horses. *American Journal of Veterinary Res* **79**: 811–819.
81. Swiger RR, Tucker JD. 1996. Fluorescence in situ hybridization: A brief review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **27**: 245-254.
82. Theelen MJP, Luiken REC, Wagenaar JA, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Rossen JWA, Zomer AL. 2021. The Equine Faecal Microbiota of Healthy Horses and Ponies in The Netherlands. Impact of Host and Environmental Factors. *Animals* **11**: 1762.
83. Traoré SI, Bilen M, Cadoret F, Khelaifia S, Million M, Raoult D, Lagier JC. 2019. Study of Human Gastrointestinal Microbiota by Culturomics in Africa. *Medicine et Sante Tropicales* **29**: 366-370.
84. Varma M, Delahunt B, McCluggage WG, Shah VI, Berney DM. 2020. Macroscopy Under the Microscope: a Critical Reappraisal of Grossing Techniques. *Histopathology* **76**: 930-933.
85. Vavra J, Joyon L. 1966. Etude sur la morphologie: Le cycle évolutif et la position systématique e callimstix cyclopis weissenberg 1912. (In Die parasitischen protozoen des wiederkäuermagen vorkommenden protozoen) *Protistologica* **2**: 5–13.
86. Videvall E, Strandh M, Engelbrecht A, Cloete S, Cornwallis ChK. 2017. Direct PCR Offers a Fast and Reliable Alternative to Conventional DNA Isolation Methods for Gut Microbiomes. *American Society for Microbiology* (e00132-17) DOI: [10.1128/mSystems.00132-17](https://doi.org/10.1128/mSystems.00132-17).
87. Weese JS, Holcombe SJ, Embertson RM, Kurtz KA, Roessner HA, Jalali M, Wismer SE. 2015. Changes in the faecal microbiota\_of mares precede the development of post partum colic. *Equine Veterinary Journal* **47**: 641–649.
88. Wei YQ, Yang HJ, Luan Y, Long RJ, Wu YJ, Wang ZY. 2016. Isolation, identification and fibrolytic characteristics of rumen fungi grown with indigenous methanogen from yaks (*Bosgrunniens*) grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Journal of Applied Microbiology* **120**: 571-587.
89. Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3741–3751.
90. Zhao C, Ivanov I, Dougherty ER, Hartman TJ, Lanza E, Colburn NH, Lupton JR, Davidson LA, Chapkin RS. 2009. Noninvasive detection of candidate molecular biomarkers in subjects

with a history of insulin resistance and colorectal adenomas. *Cancer Prevention Research* **2**: 590-597.

91. Zhao Y, Li B, Dongyi B, Huang J, Shiraigo W, Yang L, Zhao Q, Ren X, Wu J, Bao W, Dugarjaviin M. 2016. Comparison of Fecal Microbiota of Mongolian and Thoroughbred Horses by High-throughput Sequencing of the V4 Region of the 16S rRNA Gene. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **29**: 1345–1352.
92. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. 2010. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **13**: 541-547.
93. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. 2020. PCR past, present and future. *BioTechniques* **69**: 317-325.
94. Zhu Y, Wang X, Deng L, Chen S, Zhu C, Li J. 2021. Effects of Pasture Grass, Silage, and Hay Diet on Equine Fecal Microbiota. *Animals* **11**: 1330.

### *Tištěné monografie*

1. Costa M, Sturgeon A, Arroyo LG, Weese JS, Staempfli HR, 2011. The horse's 2nd genome; metagenomic investigation of the equine intestinal microbiome. In Annual Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine. Denver.
2. Frape D. 2010. Equine Nutrition and Feeding. Blackwell Publishing, Australia.
3. Munn EA. 1994. The Ultrastructure of Anaerobic Fungi. Pages 47-105 in Orpin CG, Mountfort DO, editors. Anaerobic Fungi: Biology, Ecology and Function. CRC Press, New York.

## 7 Seznam použitých zkratk a symbolů

- 16S rRNA - ribozomální RNA, je součástí malé podjednotky prokaryotického ribozomu
- BCS - Body Condition Score, stupnice tělesné kondice
- $Ca^{2+}$  - vápenatý kation
- cDNA - komplementární DNA
- ddNTP - deoxyribonukleotid (dideoxy)
- DNA - Deoxyribonukleová kyselina
- dNTP - deoxyribonukleotidtrifosfát
- DOP-PCR - PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery
- EGGD - žlázové onemocnění žaludku koní (Equine Glandular Gastric Disease)
- EGUS - syndrom žaludečních vředů koní (Equine Gastric Ulcer Syndrome)
- FISH metoda - fluorescenční in situ hybridizace
- GIT - gastrointestinální trakt
- ITS - vnitřní transkribované sekvence spacer oblasti
- ITS1 - vnitřní transkribované sekvence spacer oblasti 1
- MALDI-TOF MS - matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight, mass spectrometry
- $Mg^{2+}$  - hořečnatý kation
- mRNA - mediátorová kyselina ribonukleová
- NGS - sekvenování nové generace "next generation sequencing"
- OTU - provozní taxonomická jednotka (operational taxonomical unit)
- PCR - Polymerázová řetězová reakce
- pH - záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů ve zředěném vodném roztoku
- polyA+ - konec mRNA, který má sekvence s 40-250 adeninovými nukleotidy
- RNA - Ribonukleová kyselina
- rRNA - ribosomální RNA
- spp. - species
- TAACG - DNA sekvence (thymin, adenin, adenin, cytosin, guanin)
- TB - terabyte (násobná jednotka bytu a jednotka množství binárních dat)
- TM7 - rod bakterie
- TMK - Těkavé mastné kyseliny
- tzv - takzvaně
- VFAs - Volatile Fatty Acids, volné mastné kyseliny