

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Výskyt bifidobakterií v trávicím traktu kočkodanů

Bakalářská práce

Autor práce: Tereza Benešová

Obor studia: Speciální chovy

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neuzil Bunešová, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výskyt bifidobakterií v trávicím traktu kočkodanů" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za její odborné rady, ochotu, věnovaný čas a pomoc při zpracování této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostoru a vytvoření vhodných pracovních podmínek.

Výskyt bifidobakterií v trávicím traktu kočkodanů

Souhrn

Bifidobakterie patří mezi nejčastější rody bakterií vyskytující se v trávicím traktu lidí a zvířat, které napomáhají stabilizovat rovnováhu střevní mikrobioty a příznivě tak ovlivňují zdraví hostitele. Pro jejich pozitivní vlastnosti jsou bifidobakterie často používány jako probiotika. Z trávicího traktu volně žijících primátů bylo v posledních letech popsáno několik nových druhů bifidobakterií. Je známo, že některé druhy bifidobakterií jsou hostitelsky specifické, zatímco jiné druhy jsou běžné u více různých hostitelů. Kromě toho mnoho fyziologických charakteristik bifidobakterií může být druhově nebo kmenově specifických. Uměle vytvořené prostředí zoologické zahrady je ideální pro přenos hostitelsky nspecifických tedy multi-hostitelských druhů.

Cílem této práce byla izolace a analýza druhového zastoupení bifidobakterií v trávicím traktu kočkodanů držených v zoologických zahradách. Výsledky byly porovnány s druhovým zastoupením bifidobakterií u volně žijících primátů a dalších živočichů. Bifidobakterie byly kvantifikovány a izolovány pomocí kultivačního stanovení z trávicího traktu kočkodanů. Pro tuto práci byly použity vzorky od druhů - kočkodan Dianin (*Cercopithecus diana*), kočkodan husarský (*Erythrocebus patas*), kočkodan Campbellův (*Cercopithecus campbelli*), kočkodan bělonosý (*Cercopithecus nictitans*), kočkodan talapoin (*Miopithecus talapoin*), kočkodan Brazzův (*Cercopithecus neglectus*) a kočkodan zelený (*Chlorocebus sabaues*). Pro identifikaci získaných izolátů bifidobakterií na rodovou úroveň byla použita metoda detekce enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK) a bifidobakteriální izoláty byly následně identifikovány pomocí sekvenace genu 16S rRNA.

Bylo zjištěno, že bifidobakterie se vyskytovaly u pěti ze sedmi testovaných druhů kočkodanů. Pomocí sekvenace byly identifikovány druhy *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum* a *B. animalis* subsp. *lactis*. Jedná se o multi-hostitelské druhy, které jsou typické pro člověka a zároveň se vyskytují u dalších živočichů. Což přináší zajímavé poznatky o společných druzích bifidobakterií u starosvětských opic a u člověka. Dále detekovaný druh *B. asteroides* je typický pro hmyz se sociálním způsobem života a jeho přítomnost u kočkodanů je pravděpodobně v důsledku obsahu hmyzu v dietě. Také se podařilo izolovat bakterii rodu *Alloscardovia* sp., která jakožto i bifidobakterie náleží do čeledi *Bifidobacteriaceae*.

Klíčová slova: *Bifidobacterium* sp.; kočkodan; kultivace; identifikace; sekvenace 16S rRNA

Occurrence of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of marmosets

Summary

Bifidobacteria are among the most common genera of bacteria found in digestive tract of humans and animals, which help to stabilize the balance of intestinal microbiota and thus favorably affect the health of the host. For their positive properties, bifidobacteria are often used as probiotics. From the digestive tract of wild primates, several new species of bifidobacteria have been described in recent years. It is known that some species of bifidobacteria are host-specific, while other species are common in several different hosts. In addition, many physiological characteristics of bifidobacteria may be species or strain specific. The artificially created environment of the zoo is ideal for transferring host non-specific multi-host species.

The aim of this work was the isolation and analysis of the species representation of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of marmosets kept in zoos. The results were compared with the species distribution of bifidobacteria in wild primates and other animals. Bifidobacteria were quantified and isolated by culture assay from the digestive tract of marmosets. For this work were used samples of the species – Diana Monkey (*Cercopithecus diana*), Patas Monkey (*Erythrocebus patas*), Campbell's Monkey (*Cercopithecus campbelli*), Putty-nosed Monkey (*Cercopithecus nictitans*), Southern Talapoin Monkey (*Miopithecus talapoin*), De Brazza's Monkey (*Cercopithecus neglectus*) and Green Monkey (*Chlorocebus sabaues*). The method of detection of the enzyme fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) was used to identify the obtained bifidobacteria isolates at the genus level and the bifidobacteria isolates were subsequently identified by 16S rRNA gene sequencing.

It was found that bifidobacteria occurred in five out of seven tested species of marmosets. By sequencing were identified species *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum* and *B. animalis* subsp. *lactis*. These are multi-host species that are typical of humans and occur also in other animals. It brings interesting insights into the common species of bifidobacteria in old-world monkeys and humans. Furthermore the species *B. asteroides* is typical for insects with a social lifestyle and its presence in marmosets is probably due to the insect content of the diet. It was also managed to isolate the bacterium of the genus *Alloscardovia* sp., which as well as the bifidobacteria belong to the family *Bifidobacteriaceae*.

Keywords: *Bifidobacterium* sp.; marmoset; cultivation; identification; sequencing 16S rRNA

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Hypotéza	2
3	Cíl práce	3
4	Literární rešerše	4
4.1	Charakteristika řádu primáti	4
4.2	Morfologie primátů	4
4.3	Taxonomie kočkodanů.....	4
4.4	Kočkodanovití (<i>Cercopithecidae</i>)	5
4.4.1	Historie.....	5
4.4.2	Rozdělení	5
4.4.3	Obecná charakteristika.....	6
4.5	Trávicí trakt kočkodanů.....	7
4.5.1	Charakteristika trávicího traktu	7
4.5.2	Součásti trávicí trubice.....	7
4.6	Dieta.....	9
4.7	Mikrobiota trávicího traktu kočkodanů	9
4.8	Charakteristika rodu <i>Bifidobacterium</i>	10
4.8.1	Doména bakterie (<i>Bacteria</i>).....	10
4.8.2	Historie rodu <i>Bifidobacterium</i>	10
4.8.3	Taxonomie	11
4.8.4	Morfologie	11
4.8.5	Metabolismus.....	12
4.8.6	Fyziologie a růst.....	14
4.8.7	Výskyt.....	14
4.8.8	Kvantifikace bifidobakterií	19
4.8.9	Identifikace bifidobakterií.....	19
4.8.1	Význam	20
4.8.2	Probiotika.....	21
4.8.3	Prebiotika	21
4.8.4	Synbiotika	22
5	Metodická část a materiál	23
5.1	Odběr vzorků.....	23
5.2	Použité vzorky	23
5.3	Použitá média pro detekci bifidobakterií.....	24

5.4	Rozbor	24
5.5	Izolace DNA	26
5.6	MALDI-TOF MS (extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí)	26
5.7	Test na detekci enzymu F6PPK	26
5.8	Identifikace získaných izolátů bifidobakterií	27
6	Výsledky	28
7	Diskuze	32
8	Závěr.....	34
9	Seznam použité literatury.....	35

1 Úvod

Mikrobiota trávicího traktu je v současnosti velice diskutovaným tématem. Představuje společenství mikroorganismů v různých částech GIT živočichů včetně člověka. Tyto mikroorganismy zastávají různé funkce např. bariérovou, metabolickou, regulační a další. Mnohdy hostiteli prospívají, ale mohou i škodit. Aktivitu a obsah střevní mikrobioty ovlivňují faktory jako je složení potravy, věk, zdraví, stres, aj. Složení se postupně vyvíjí v průběhu života a je odlišné pro každého jedince. Významným bakteriálním rodem nacházejícím se v trávicím traktu živočichů zejména v období mléčné výživy je rod *Bifidobacterium*.

Bifidobakterie jsou grampozitivní, anaerobní a nepohyblivé bakterie. Jsou prospěšnou součástí trávicího traktu lidí i zvířat. Jejich výskyt je velice rozmanitý, nacházejí se v celém trávicím traktu a jejich četnost se v různých částech GIT mění. Jedná se o sacharolytické bakterie, které jsou schopny využít jak hostitelské glykany, tak různé rostlinné oligosacharidy. Jejich přítomnost ve vysokém počtu je žádoucí a je spojována s dobrým zdravím hostitele. Mezi zdravotní přínosy patří hlavně léčba a prevence gastrointestinálních poruch a udržení zdraví trávicího traktu. Pro jejich pozitivní vlastnosti jsou často používány jako probiotika.

V posledních letech byly objeveny nové druhy u primátů jako je např. *B. reuteri*, *B. callitrichos*, *B. saguini*, *B. stollenboschense*, *B. biavatti* a další. Tato práce je zaměřena na výskyt bifidobakterií v trávicím traktu kočkodanů.

Kočkodanovití (*Cercopithecidae*) jsou početnou skupinou primátů dělicí se do dvou podčeledí a to kočkodani (*Cercopithecinae*) a hulmani (*Colobinae*). Přičemž práce se zabývá podčeledí kočkodani, kam patří např. kočkodan Dianin, kočkodan Roloway, kočkodan obecný, aj. Jejich strava je složená hlavně z rostlinné části jako je např. ovoce, zelenina, plody, kůra a také z živočišné části kdy se živí hmyzem, malými hlodavci, drobnými ptáky, ptačími vejci apod. Z čehož je možné předpokládat, že se v jejich trávicím traktu vyskytují bifidobakterie.

2 Hypotéza

Bifidobakterie patří mezi nejčastější rody bakterií vyskytující se v trávicím traktu lidí a zvířat, kde napomáhají stabilizovat rovnováhu střevní mikrobioty a příznivě tak ovlivňují zdraví hostitele. Z trávicího traktu převážně volně žijících primátů bylo v posledních letech popsáno několik nových druhů bifidobakterií. Výskyt bifidobakterií u volně žijících ani uměle držených kočkodanů nebyl doposud monitorován. Uměle vytvořené prostředí zoologické zahrady je ideální pro přenos hostitelsky nesespecifických tedy multi-hostitelských druhů.

Hypotéza: V trávicím traktu kočkodanů držených v zoologických zahradách budou detekovány spíše multi-hostitelské druhy bifidobakterií.

3 Cíl práce

Cílem práce byla izolace a analýza druhového zastoupení bifidobakterií v trávicím traktu kočkodanů držených v zoologických zahradách. Výsledky byly porovnány s druhovým zastoupením bifidobakterií u volně žijících primátů a dalších živočichů.

4 Literární rešerše

4.1 Charakteristika řádu primátů

Primátů jsou prastarou a členitou skupinou placentálů, čítající okolo 233 žijících druhů dělených do 13 rodů. Většina z nich obývá pás tropických lesů. Nejmenší žijící primát je maki malý, který váží v průměru 30 g. Největšími jsou naopak zástupci rodu goril, u kterých se váha pohybuje až okolo 175 kg (Napier and Groves, 2017).

Primátů obývají lesní stanoviště a mnoho jejich charakteristik, podle kterých je rozeznáváme (zkrácené rostrum, očníce směřované dopředu, poměrně velká mozkovina, protistojný palec) se pravděpodobně vyvinulo jako adaptace na život v korunách stromů anebo se jako primitivní znak zachovalo ze stejného důvodu. Primátů se obvykle dají rozeznat na základě souboru primitivních znaků lebky, zubů a končetin (Myers, 2000).

4.2 Morfologie primátů

Současní primátů jsou rozděleni do dvou velkých skupin, poloopice a vyšší primátů. Poloopice mají neosrstěný nos, uzavřené očníce, spodní řezáky a špičáky vytvářející zubní hřebínek. Dalším specifickým znakem je dlouhý dráp na druhém nebo třetím prstu, který slouží k upravování srsti nebo k hygieně. Vyšší primátů mají naopak osrstěný nos, zmenšené očníce, nemají zubní hřebínek. Vyšší primátů zahrnují mnohem více druhů, jsou více rozšířeni a ve většině oblastí rozšíření plní důležitou ekologickou funkci. Vyšší primátů se dále rozdělují na dvě oddělení a to na ploskonosé a úzkonosé (Myers, 2000).

Ploskonosí mají ploché nosy a nozdry směřující od sebe, zatímco úzkonosí mají nozdry párově směřující dolů a blízko u sebe. Ploskonosí mají rozšíření areálu po celém světě. Úzkonosí se vyskytují v oblastech Afriky, Evropy a Asie (Napier and Groves, 2017).

Většina druhů primátů žije v tropických nebo subtropických oblastech, některé druhy obývají také oblasti mírného pásu. Až na pár výjimek pozemních druhů jsou primátů lesním druhem. Některé druhy se živí listy nebo ovocem, ostatní mohou být hmyzožraví nebo masožraví (Myers, 2000).

4.3 Taxonomie kočkodanů

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Kmen: Strunatci (*Chordata*)

Podkmen: Obratlovci (*Vertebrata*)

Nadtřída: Čtyřnožci (*Tetrapoda*)
Třída: Savci (*Mammalia*)
Nadřád: Placentálové (*Placentalia*)
Řád: Primáti (*Primates*)
Podřád: Vyšší primáti (*Haplorrhini*)
Infrařád: Opice (*Simiiformes*)
Oddělení: Úzkonosí (*Catarrhini*)
Čeleď: Kočkodanovití (*Cercopithecidae*)
Podčeleď: Kočkodani (*Cercopithecinae*)

(Myers et al., 2018). Dostupné z:

<https://animaldiversity.org/accounts/Cercopithecinae/classification/#Cercopithecinae>

4.4 Kočkodanovití (*Cercopithecidae*)

4.4.1 Historie

Čeleď kočkodanovití zahrnuje 133 druhů (Klappenbach, 2016). Tyto opice jsou široce rozšířené od jižní Evropy (Gibraltar) přes severozápadní Afriku, po jih Sahary až do jihovýchodní Asie, Číny a Japonska. Některé druhy kočkodanovitých vykazují vyšší toleranci na nízké teploty, jako žádný jiný primát kromě člověka. Například jeden druh makaka obývá studenou a zasněženou severní část Japonska. Nejstarší záznamy o kočkodanovitých pocházejí z oligocénického Egypta. Všechny fosilní nálezy pocházejí ze „starého světa“ (Afrika, Evropa, Asie), tudíž se shodují s dnešním výskytem kočkodanovitých. Některé z vyhynulých druhů se velikostí přibližovali dnešním gorilám, ne však robustností (Myers, 2000).

4.4.2 Rozdělení

Kočkodanovití (*Cercopithecidae*) se dělí do dvou ekologicky a morfologicky rozdílných podčeledí. Kočkodani (*Cercopithecinae*) jsou všežravci, mají ve tvářích vaky, ve kterých hromadí potravu a mají jednoduché žaludky, zatímco hulmani (*Colobinae*) se živí převážně listy (folivoři), nemají vaky a mají charakteristický složený žaludek, který obsahuje celulólytické bakterie (Disotell, 2003).

Tato práce se zabývá podčeledí kočkodani, mezi které se řadí rody: archaičtí kočkodani (*Allenopithecus*) s jediným zástupcem – kočkodan Allenův (*Allenopithecus nigroviridis*); mangabejové (*Cercocebus a Lophocebus*) z nichž nejznámější z rodu *Cercocebus* - mangabej rudohlavý (*Cercocebus torquatus*), mangabej bělokrký (*Cercocebus atys lunulatus*) a z rodu

Lophocebus – mangabej černý (*Lophocebus atterimus*), mangabej plástíkový (*Lophocebus albigena*); lesní kočkodani (*Cercopithecus*) – kočkodan Dianin (*Cercopithecus diana*), kočkodan Roloway (*Cercopithecus roloway*), kočkodan černolící (*Cercopithecus ascanius*), kočkodan diadémový (*Cercopithecus mitis*) atd.; lesostepní kočkodani (*Chlorocebus*) – kočkodan obecný (*Chlorocebus aethiops*) a kočkodan zelený (*Chlorocebus sabaeus*); stepní kočkodani (*Erythrocebus*) s jediným zástupcem – kočkodan husarský (*Erythrocebus patas*); makakové (*Macaca*) – makak rhesus (*Macaca mulata*), makak červenolící (*Macaca fuscata*), makak jávský (*Macaca fascicularis*), makak lví (*Macaca silenus*) a další; mandrilové (*Mandrillus*) – dril (*Mandrillus leucophaeus*), mandril (*Mandrillus sphinx*); trpasličí kočkodani (*Miopithecus*) – kočkodan talapoin (*Miopithecus talapoin*), kočkodan talapoin severní (*Miopithecus ogouensis*); paviáni (*Papio*) – pavián plástíkový (*Papio hamadryas*), pavián anubi (*Papio anubis*) a další; dželady (*Theropithecus*) – dželada (*Theropithecus gelada*) (Myers et al., 2018).

4.4.3 Obecná charakteristika

Kočkodanovití jsou opice střední až větší velikosti o hmotnosti mezi 1,5 až 50 kg. Mnoho z nich má podsaditý tvar těla. Jejich nosní dírky jsou blízko u sebe a směřují dolů. Přední končetiny jsou kratší než zadní končetiny. Na všech prstech mají nehty, které jsou ploché, nejsou zakřivené, jak je tomu například u malpovitých (*Cebidae*). Mají chápavý palec na předních i zadních končetinách až na druh gueréza (*Colobus*), která palec na ruce téměř nemá nebo je zakrnělý. Dlaně a chodidla jsou neochlupená. Mají ocas, který může být dlouhý nebo zakrnělý, ale nikdy není plně chápavý. Mnoho kočkodanovitých může mít na hýždích světlé části ztvrdlé kůže. Používají se jako znak dominance a jako sexuální vábidla. Svalová část obličeje je velmi dobře vyvinutá a obličejové výrazy mohou hrát důležitou roli při jejich společenském chování. Srst těchto opic je většinou hnědě nebo šedě zbarvená, u některých s výraznými světlejšími odstíny. V porovnání například s malpovitými mají kočkodanovití robustnější a hrbolatější lebku (Myers, 2000).

Mezi jednotlivými druhy se vyskytují mírné odchylky vzhledu a výrazná variace zbarvení srsti, od zlatozelené, např. u kočkodana zeleného (*Chlorocebus sabaeus*), až po tmavší hnědou, např. u kočkodana d'amd'amového (*Chlorocebus djamdjamensis*). Kočkodani mají bledě žluté nebo bílé náprsenky a černé obličeje. Mají kratší vousky a černé přední končetiny, nohy a špičku ocasu. Kočkodan zelený má žluté vousky, šedivé přední i zadní končetiny a žlutočerný ocas. Samci všech druhů mají modrou kůži na břicho, modrou kůži na šourku a červený penis (Rafferty, 2013).

Kočkodanovití jsou téměř výhradně denní živočichové. Vykazují různé druhy sociálního chování. Většina z nich může být viděna ve velkých skupinách, kde interakce mezi jednotlivci mohou být velmi složité. Základní jednotkou se jeví být rodinná skupina (tlupa), ale občas vytvářejí i větší tlupy. Většina kočkodanovitých žije na stromech s výjimkou paviánů, kteří tráví život na zemi. Mnoho kočkodanovitých má výrazný pohlavní dimorfismus. Mohou se lišit velikostí těla, kdy jsou samci až 2x větší než samičky, dále pak zbarvením nebo vývinem tesáků (Myers, 2000).

Kočkodany řadíme mezi všežravé, živí se rostlinami, hmyzem a jinými bezobratlými, malými obratlovci a houbami. Je u nich běžné kooperativní hledání potravy. Kočkodani jsou kořistí pro několik velkých predátorů, například pro leopardy, krajty, dravce, ale i pro člověka. Tyto opice používají sofistikovaný systém vokalizací, aby upozorňovali ostatní ve skupině na potenciální útoky. Různé signály určují typ predátora, který ohrožuje skupinu. Tyto signály vytvářejí kolektivní reakci, a to buď hledání útočiště, nebo čelení hrozbě. Například jedna signalizace představuje hrozbu velké kočkovité šelmy (leoparda), který vede skupinu k tomu, aby se dostala do korun stromů, zatímco jiná varuje před dravými ptáky, signalizující skupině, aby se skrývala v husté vegetaci. Vědci zjistili další signalizaci používající se ke zpozorování číhajícího hada ve vysoké trávě, která vede tlupu k tomu, aby se rojila a snažila se hada zneškodnit (Rafferty, 2013).

4.5 Trávicí trakt kočkodanů

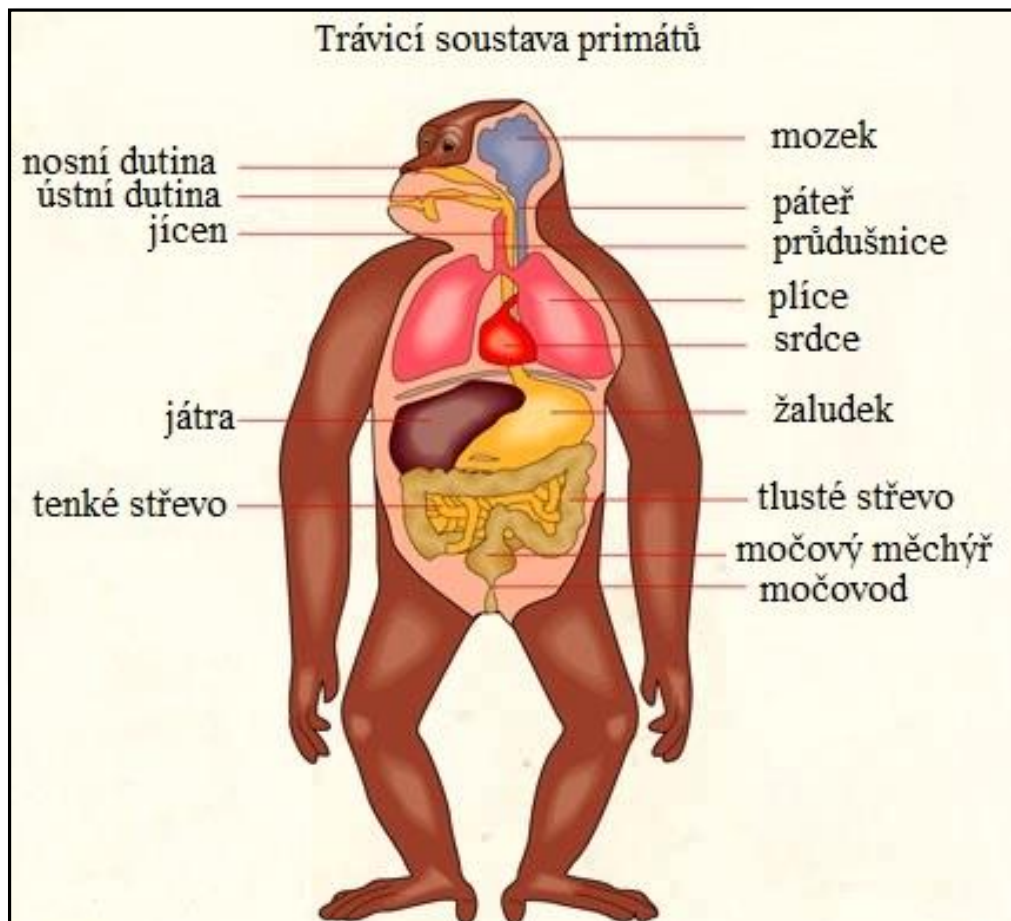
4.5.1 Charakteristika trávicího traktu

Trávicí trakt kočkodanů se jako u většiny savců skládá z trávicí trubice (kompletní zažívací trakt) a různých přídatných žláz, které vylučují trávicí šťávy. Mezi přídatné žlázy savčího zažívacího traktu patří tři páry slinných žláz, žlázy slinivky břišní, játra a jeho skladovací orgán žlučník. Struktura stěny gastrointestinálního traktu představuje vzor společný pro všechny obratlovce: vnitřní stěna sliznice je oddělena pojivovou tkání od vnější stěny nejméně dvěma vrstvami svalů. Potrava se pohybuje podél stěny trubice kontrakcemi hladké svaloviny. Tyto rytmické kontrakční vlny se nazývají peristaltika. Regulace průchodu materiálu z jedné části (komory) do druhé části uvnitř trubice je řízena kruhovými chlopněmi nazývanými svěrači (Chivers and Hladik, 1980).

4.5.2 Součásti trávicí trubice

Trávicí trubice začíná přijímacím otvorem (ústy). Zde dochází k rozmělnění potravy pomocí zubů (*dentes*) a k promíchání potravy se slinami, které usnadňují mechanické

zpracování a polykání soust. Následuje hltan (*pharynx*), což je společný průchod ústní a nosní dutiny. Hltan vede k jícnu (*esophagus*), svalové trubici, která spojuje hltan se žaludkem, stavebně i funkčně je přizpůsobený k transportu potravy do žaludku. Žaludek (*ventriculus*) slouží k přechodnému uskladnění přijímané potravy, k její přípravě pro trávení a probíhá v něm vlastní trávení žaludeční šťávou. Z žaludku přechází natrávená potrava do horní části tenkého střeva (*intestinum tenue*), nazývaného dvanáctník, kde bakterie trávicích enzymů pokračují v trávicím procesu. Produkty trávení poté přechází přes stěnu tenkého střeva do krevního řečiště. Druhou a zároveň nejdelší částí tenkého střeva je lačník. Poslední částí je kyčelník, který ústí do slepého střeva. Na tenké střevo navazuje tlusté střevo (*intestinum crassum*). Tlusté střevo je důležitý úsek pro konečné využití krmiva, vstřebávání vody, minerálních látek a vitamínů, začíná slepým střevem, pokračuje tračníkem a posledním úsekem je konečník, který vyúsťuje řitním otvorem (Kumar, 2003).



Obrázek č. 1 – Trávicí trakt primátů upravený z <https://infovisual.info/en/biology-animal/internal-anatomy-of-a-monkey> (Dery, 2016)

4.6 Dieta

Strava všech primátů včetně kočkodanů je faktorem jejich ekologie, který během svého vývoje jednoznačně hrál důležitou roli v jejich rozptylu a adaptaci, stejně jako ve vývoji zubů, čelistí a trávicího systému. Strava je také úzce spojena s pohybovou aktivitou a velikostí těla. Hlavní složení potravy se dělí na rostlinnou (zelenina, ovoce, květy, listy, ořechy, kůry, semena, trávy, stonky, kořeny a hlízy) a živočišnou část (drobní ptáci, ptačí vejce, ještěrky, malý hlodavci, hmyz, žáby a korýši). I když je dieta selektivní a specifická pro řadu skupin savců, pro primáty je obtížné stanovit přísná a pevná pravidla. Je nalezeno poměrně málo příkladů potravní specializace. Obecně řečeno jsou primáti všežraví, jak dokládá fyziologie jejich trávicího systému. Jsou však zřejmé určité potravní a dietní preference.

Byla stanovena mezní hranice přibližně 500 g jako horní hranice pro druhy živící se převážně hmyzem a dolní limit pro druhy, který se živí listím (Kayův práh, podle primatologa Richarda Kaye, který jako první na mezní hranici upozorňoval). Důvodem byla velikost hmyzu a jeho obtížné zachycení pro velké zvíře. Na druhé straně celulózové a hemicelulózové složky listů vyžadující složité trávicí procesy čehož malé zvíře není schopné a nezvládá udržet konstantní průchodnost střev. Zatímco ovoce se jako dietní složka nevyznačuje žádným z těchto omezení a je tedy nejvhodnější součástí diety (Napier and Groves, 2017).

4.7 Mikrobiota trávicího traktu kočkodanů

Mikrobiota gastrointestinálního traktu (GIT) je soubor organismů žijících v trávicí soustavě živočichů včetně člověka. Zahrnuje bakterie, viry, prvoky a řadu dalších mikroorganismů, což hraje klíčovou roli ve zdraví hostitele, v rámci uskutečnění jeho nutričních, fyziologických a imunologických funkcí (Tannock, 1995). Metabolická aktivita střevní mikrobioty je považována za srovnatelnou s metabolismem jater a zahrnuje zejména fermentaci exogenních a endogenních zdrojů uhlíku a energie (Isolauri et al., 2004). Velmi známé faktory jako je složení potravy, věk, zdraví, stres, aj. ovlivňují aktivitu a složení střevní mikrobioty. Je zřejmé, že populace bakterií se mezi jednotlivci liší (Simpson et al., 2002).

Vývoj savčí střevní mikroflóry začíná při narození, kolonizací sterilního gastrointestinálního traktu novorozence bakteriemi, které jsou v těle matky nebo v okolním prostředí (Yatsunencko et al., 2012). V prvních 6 – 12 měsících po narození je střevní mikroflóra v neustálém toku a její biologická rozmanitost se postupně rozšiřuje, protože výživa mláďete se vyvíjí výhradně od mateřského mléka a jeho složení (De Filippo et al., 2010). Bifidobakterie

patří mezi první kolonizátory střev novorozenců, které jsou bohatou složkou střevní mikrobioty různých zvířat (včetně lidí) (Turrone et al., 2009a). Kromě toho bylo prokázáno, že bifidobakterie hrají zásadní roli v mnoha biologických procesech, jako je vývoj GIT, tvorba hlenové vrstvy, ochrana proti patogenům, imunita a podílí se na zpracování nestravitelných složek potravy (Ventura et al., 2012). Po ukončení mléčné výživy se formuje mikrobiota dospělého jedince, která se různorodě vyvíjí na základě okolního prostředí. Savčí mikrobiota trávicího traktu je složena cca z 500 až 1000 bakteriálních druhů (Kim et al., 2011).

Primáti patří mezi druhy s adaptivní zažívací strategií, kde převládá fermentace potravy v kaudální části trávicího kanálu. Hulmani z čeledi kočkodanovití mají velký a strukturálně složitý žaludek, zatímco kočkodani mají typický jednoduchý žaludek (Chivers and Hladik, 1980). Z hlediska mikrobiálního osídlení střevní mikroflóry byly u primátů nalezeny laktobacily, enterokoky, *Escherichia coli*, bakterie rodu *Clostridium* a mnoha dalších. Bylo zjištěno, že bifidobakterie tvoří 20 – 30 % z celkového počtu přítomných bakterií (Bauchop, 1971).

4.8 Charakteristika rodu *Bifidobacterium*

4.8.1 Doména bakterie (*Bacteria*)

Bakterie jsou prokaryotické organismy, které se řadí mezi nejstarší organismy na Zemi. Existuje jich až milion druhů, z nichž bylo objeveno a popsáno jen přibližně tři tisíce. Řadí se mezi jednobuněčné organismy, které jsou schopné získat energii a výživu z anorganických zdrojů. Postupným vývojem došlo ke změně mnoha znaků, například vysoká nezávislost na prostředí, kdy se některé bakterie přizpůsobovaly prostředí a tím ztrácely schopnost stavby těla z anorganických zdrojů, tedy bylo nutné doplnit výživu o aminokyseliny či cukry. Vlastnosti bakterií žijících v okolí člověka jsou dány zejména charakterem jeho životního prostředí (Schindler, 2014).

4.8.2 Historie rodu *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly poprvé objeveny a izolovány z výkalů kojence kolem roku 1900 francouzským pediatrem Henrym Tissierem v Pausterově institutu (Russel et al., 2011). Tyto bakterie připomínající tvar písmene Y Tissier pojmenoval *Bacillus bifidus*. Od roku 1900 do roku 1957 se název těchto bakterií různě obměňoval. V roce 1917 byly tyto bakterie zařazeny do čeledi *Lactobacillaceae*, následně v roce 1920 byly pojmenovány *Lactobacillus bifidus* (Biavati et al., 2000). O několik let později uznal Orla-Jensen existenci samostatného rodu *Bifidobacterium* (Maxa, Rada, 2002). Zjistil, že bifidní bakterie jsou heterofermentativní a

hlavním metabolitem je kyselina octová, vedle poměrně vysokého podílu kyseliny mléčné a bez produkce oxidu uhličitého. Ale vzhledem k podobnosti s laktobacily byly tyto bakterie po většinu dvacátého století klasifikovány jako členové rodů *Bacil*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus* a *Corynebacterium* (Russel et al., 2011). V roce 1963 Reuter rozpoznal a pojmenoval, z původně jediného představitele *Bifidobacterium bifidum*, dalších pět rozdílných druhů. O pár let později se začalo rozlišovat jedenáct různých druhů a v publikaci z roku 1986 se autoři zmiňují o 24 druzích bakterií tohoto rodu (Voříšek, 1989).

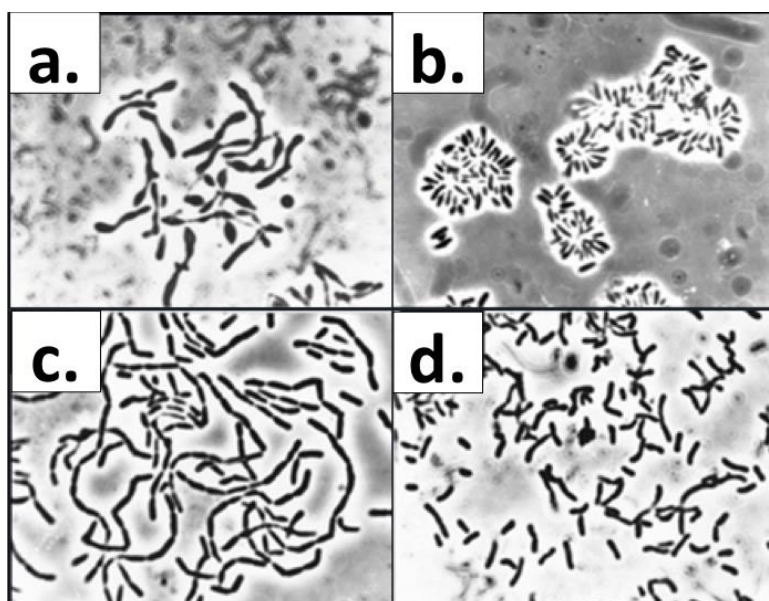
V roce 2014 náleželo rodu *Bifidobacterium* 48 druhů a poddruhů a objevy nových druhů stále pokračují (Bunešová et al., 2014). V současnosti rod zahrnuje již 58 druhů a 10 poddruhů (bacterio.net).

4.8.3 Taxonomie

Bifidobakterie lze taxonomicky zařadit do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteriadae*, řádu *Bifidobacteriales*, čeledi *Bifidobacteriaceae* a rodu *Bifidobacterium* (Garrity et al., 2004).

4.8.4 Morfologie

Bifidobakterie jsou grampozitivní, anaerobní a nepohyblivé bakterie. Mohou se vyskytovat samostatně nebo ve shlucích, nevytváří spory. Nejčastěji se objevují ve formě nepravidelných tyčinek ve tvaru V nebo Y. Jsou katalázanegativní, kromě *B. asteroides* a *B. indicum*, které jsou katalázapozitivní za přítomnosti kyslíku. Buněčná stěna je typická pro grampozitivní bakterie. Skládá se ze silné peptidoglykanové vrstvy, která obsahuje hlavně polysacharidy, bílkoviny a kyselinu teichovou (Biavati et al., 2000).



Obr. č. 2 - Morfologie rodu *Bifidobacterium*, s využitím fázového kontrastního mikroskopu, zvětšení 1500x, a – *B. bifidum*, b – *B. asteroides*, c – *B. pullorum*, d – *B. ruminantium* (McIlroy et al., 2015).

Kolonie bifidobakterií mohou být hladké rovné nebo vypouklé ohraničené, smetanově bílé barvy s lesknoucím se povrchem a měkkou konzistencí. Například *B. angulatum* vykazují klínové či palisádové uspořádání, *B. animalis* mají rozšířenou středovou část. Velmi specifické uspořádání mají bakterie *B. asteroides*, které tvoří neobvyklé útvary připomínající tvar hvězdice (Fuquay et al., 2011).

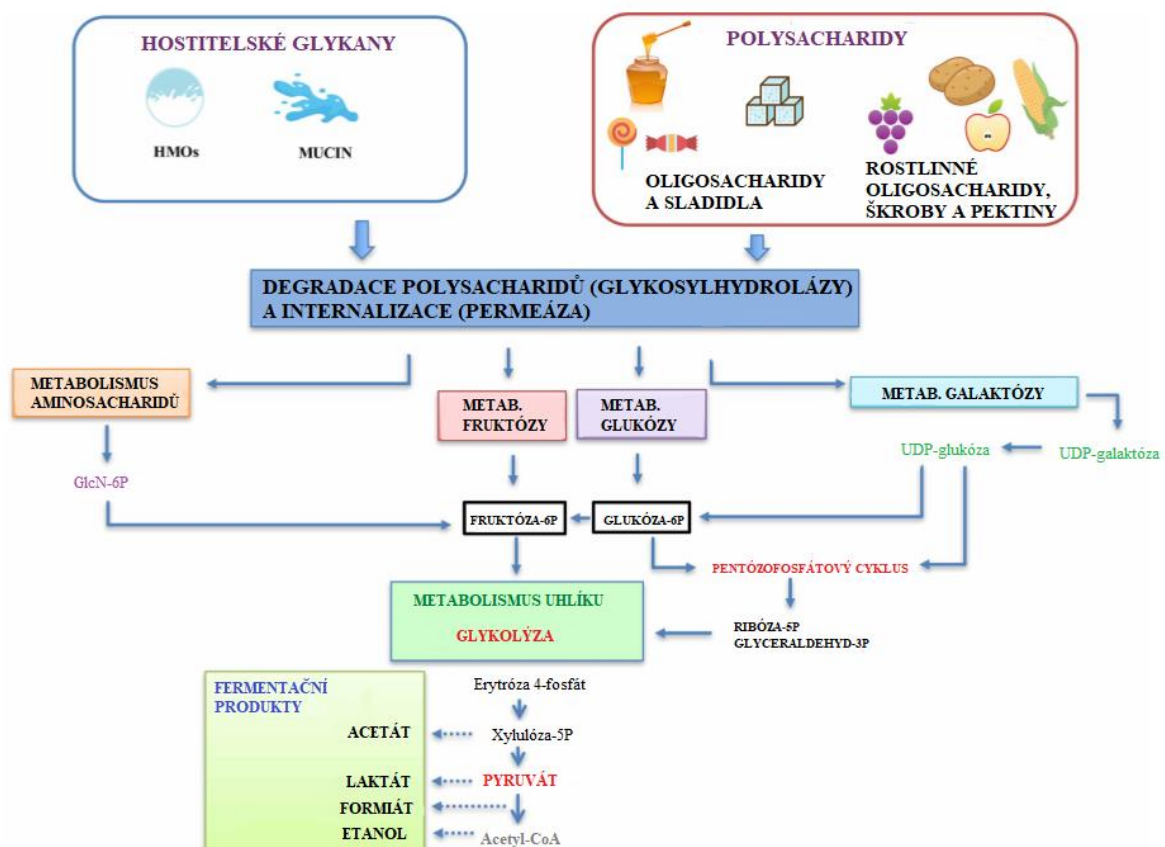
Na základě morfologických znaků nelze odlišit bifidobakterie od příbuzných rodů, kterými jsou *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*.

4.8.5 Metabolismus

Pro rod *Bifidobacterium* je specifické štěpení různých sacharidů pomocí enzymu fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza (F6PPK). Díky tomuto enzymu jsou bifidobakterie schopny rozkládat hexózy. Enzym F6PPK katalyzuje štěpení fruktóza-6-fosfátu na erythróza-4-fosfát a acetyl-fosfát, který reaguje s FeCl_3 za vzniku fialové barvy, to umožňuje rozlišit bifidobakterie od morfologicky podobných druhů při provedení biochemického testu (Tannock, 1999). Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy, které jsou schopné fermentovat glukózu, galaktózu a fruktózu. Jsou známy rozdíly ve fermentaci různých sacharidů a alkoholů mezi jednotlivými kmeny či druhy bifidobakterií (Pokusaeva et al., 2009). Jen minimální počet kmenů je schopen zkvašovat mannitol nebo sorbitol. Součástí některých bifidobakterií jsou

extracelulární nebo intracelulární enzymy, které jsou schopny katalyzovat hydrolyzu polysacharidů, jako jsou amylóza, amylopektin, pektin a xylan (Biavati et al., 2000).

Erythróza-4-fosfát a acetyl-fosfát jsou dále metabolizovány až na kyselinu octovou a mléčnou, které vznikají v molárním poměru 3:2 (Doleyres and Lacroix, 2005). Jsou známy některé druhy bifidobakterií, které jsou schopné vytvářet organické kyseliny a etanol, který má vliv na jejich růst. Díky produkci organických kyselin jsou tyto bakterie využívány jako probiotika, jelikož jejich tvorba brání rozvoji patogenních bakterií v trávicím traktu. K tvorbě kyseliny máselné, propionové a oxidu uhličitého nedochází (Felis and Dellaglio, 2007). Štěpením pyruvátu na kyselinu mravenčí a octovou a současně také redukcí acetátu na etanol může docházet ke změně fermentační rovnováhy konečných produktů (Fuquay et al., 2011).



Obrázek č. 3 - Bifidobakteriální degradační a fermentační cesty metabolismu sacharidů (Bottacini et al., 2017)

4.8.6 Fyziologie a růst

Jsou striktně anaerobní, tedy kyslík je pro ně toxický, ale některé kmeny jsou schopny tolerovat malou koncentraci kyslíku v přítomnosti CO₂. Teplotní minimum pro růst těchto bakterií je 25-28 °C, naopak teplotní maximum se pohybuje v rozmezí 43-45 °C (Scardovi, 1986). Optimální teplota pro růst bifidobakterií je 37-41 °C. Všeobecně je uváděno, že zastavení růstu nastává při teplotě nižší než 20 °C a teplotě vyšší než 46 °C (Biavati et al., 2000). Existují však výjimky jako např. *B. thermacidophilum* jehož růstové optimum může být až 49,5 °C, naopak druh *B. psychroaerophilum* je schopen růst při teplotě 8 °C (Cronin et al., 2011).

Optimální pH pro růst bifidobakterií se pohybuje v rozmezí 6,5-7,0. Hraniční hodnota pH, při které k růstu nedochází je 4,5-5,0 a nižší a naopak 8,0-8,5 a vyšší (Scardovi, 1986). Vyskytují se ale i výjimky, jako je například druh *B. thermacidophilum*, u kterého byl zaznamenán růst i při hodnotě pH 4,5 (Biavati et al., 2000). Některé druhy jsou schopné přežít i při hodnotě pH 3,5, například druh používaný do kysaných probiotických výrobků *B. animalis* subsp. *lactis*, který dobře přežívá v kyselém prostředí (Maus and Ingham, 2003). Schopnost odolávat solím žlučové kyseliny nebo kyselému prostředí je v rámci tohoto rodu velmi variabilní a zároveň je velmi důležitá pro přežití mikroorganismů při průchodu trávicím traktem (Waddington et al., 2010).

4.8.7 Výskyt

Bifidobakterie jsou přirozenou součástí trávicího traktu lidí i zvířat. Je možné je izolovat z výkalů, z bacheru dobytka, z lidské vagíny, z kanalizačních vod, ze zubního kazu a plaku, dále pak z medu a včelího zažívacího traktu (Felis and Dellaglio, 2007). Vyskytují se v celém trávicím traktu a jejich počet je v jednotlivých částech různý. Jejich přítomnost je žádoucí a příznivě ovlivňuje zdraví hostitele (Bunešová et al., 2014). Bifidobakterie je možné rozdělit dle jejich místa výskytu do šesti ekologických nik: lidské střevo, ústní dutina, potraviny, gastrointestinální trakt zvířat, střeva hmyzu a odpadní vody (Ventura et al., 2004).

Mnoho druhů bifidobakterií bylo nalezeno ve stolici králíků, kuřat, skotu, myší a selat, z nichž některé se zdají být hostitelsky specifické jako například *B. magnum* a *B. cuniculi*, které byly nalezeny pouze ve stolici králíků. Z výkalů telete, krávy a kuřete byly izolovány druhy *B. animalis*, *B. magnum*, *B. pseudolongum*, *B. globosum*, *B. merycicum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare* a *B. cuniculi*. Dále pak byly bifidobakterie objeveny také v ústní dutině a to *B. dentium*, která způsobují zubní plak a pravděpodobně jsou zodpovědné za vznik zubních kazů (Ventura et al., 2004). Dalším příkladem výskytu některých druhů bifidobakterií je mléko a mléčné výrobky. Jsou to druhy *B. animalis* subsp. *lactis* izolované z jogurtu, *B. crudilactis*

objeveny v syrovém mléce a sýrech a *B. mongoliense* izolované z mléka koní (Bunešová et al., 2014).

V nedávné době bylo popsáno mnoho nových druhů bifidobakterií z gastrointestinálního traktu primátů. V roce 2010 bylo izolováno 5 atypických kmenů bifidobakterií z výkalů kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) a tamarína žlutorukého (*Saguinus midas*). Na základě podrobnějších rozborů bylo stanoveno 5 nových druhů: *B. reuteri*, *B. callitrichos*, *B. saguini*, *B. stellenboschense* a *B. biavatii* (Endo et al., 2012). O dva roky později byl objeven a popsán nový druh izolovaný z výkalů gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) nazvaný *B. moukalabense* (Tsuchida et al., 2014). Z výkalů mláděte kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) byly získány další nové taxony: *B. myosotis*, *B. tissieri* a *B. hapali*. V roce 2015 byl objeven druh *B. lemurum*, získaný z výkalů lemura kata (*Lemur catta*) (Modesto et al., 2015). Po sléze v roce 2016 byly objeveny druhy *B. aerophilum*, *B. avesanii* a *B. ramosum*, které byly izolované z trávicího traktu tamarína pinčího (*Saguinus oedipus*), dále pak *B. eulemuris* získaný z výkalů lemura černého (*Eulemur macaco*) (Michelini et al., 2016). Všechny zmíněné nové druhy bifidobakterií pocházejí z jedinců žijících v přirozeném nebo alespoň částečně přirozeném prostředí. Naopak ve výkalech orangutana a šimpanze chovaných v zoologické zahradě byly objeveny druhy *B. adolescentis* a *B. dentium*, které jsou typické pro člověka (D'Aimmo et al., 2014).

Tabulka č. 1 - Seznam druhů rodu *Bifidobacterium*, tučně zvýrazněny druhy vyskytující se u primátů (Dostupné z: <http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html>)

Druh, poddruh	Izolováno z:	Izoloval, rok	Kód DSM
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i>	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	Killer et al., 2011	22766
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Střevo dospělého člověka	Reuter, 1963	20083
<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	Výkaly dospělé tamarína pinčiho (<i>Saguinus oedipus</i>)	Michelini et al., 2017	100689
<i>Bifidobacterium aesculapii</i>	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	Modesto et al., 2014	26737
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	Lidské výkaly	Scardovi and Crociani, 1974	20098
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Výkaly kuřat	Scardovi and Trovatielli 1974 emend. Masco et al. 2004	20105
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kryší výkaly	Masco et al., 2004	20104
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Jogurt	Masco et al., 2004	10140
<i>Bifidobacterium apri</i>	Tlusté střevo divokého prasete	Pechar et al., 2017	100238
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Trávicí trakt včely medonosné	Scardovi and Trovatielli, 1969	20089
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>	Vodní kefir	Laureys et al., 2016	LMG 28769
<i>Bifidobacterium biavatii</i>	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al., 2012	23969
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Lidské výkaly	Orla-Jensen, 1924	20456
<i>Bifidobacterium bohemicum</i>	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	Killer et al., 2011	22767
<i>Bifidobacterium bombi</i>	Trávicí trakt čmeláka (<i>Bombus lucorum</i>)	Killer et al., 2009	19703
<i>Bifidobacterium boum</i>	Bachor skotu	Scardovi et al., 1979	20432
<i>Bifidobacterium breve</i>	Střeva kojence	Reuter, 1963	20213
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	Endo et al., 2012	23973
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	Lidské výkaly	Scardovi and Crociani, 1974	16992
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Výkaly selete	Scardovi et al., 1979	20434
<i>Bifidobacterium commune</i>	Střevo čmeláka (<i>Bombus lapidarius</i>)	Praet et al., 2015	28792

<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	Trávicí trakt včely medonosné	Biavati et al., 1982	20216
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	Králičí výkaly	Scardovi et al., 1979	20435
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Zubní kaz	Scardovi and Crociani, 1974	20436
<i>Bifidobacterium eulemuris</i>	Výkaly lemura (<i>Eulemur macaco</i>)	Michelini et al., 2016	100216
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	Střevo dospělého člověka	Lauer 1990	20093
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	Slepé střevo kuřete	Watabe et al., 1983	20670
<i>Bifidobacterium hapali</i>	Výkaly mláďat kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i>)	Michelini et al., 2016	100202
<i>Bifidobacterium indicum</i>	Trávicí trakt včely medonosné	Scardovi and Trovatelli, 1969	20214
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	Stolice kojence	Morita et al., 2011	21854
<i>Bifidobacterium lemorum</i>	Výkaly lemura (<i>Lemur catta</i>)	Modesto et al., 2015	28807
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Střevo kojence	Mattarelli et al., 2008	20088
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	Lidské výkaly	Mattarelli et al., 2008	20219
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suillum</i>	Výkaly selete	Yanokura et al., 2015	28597
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>suis</i>	Výkaly prasete	Matteuzzi et al., 1971	20211
<i>Bifidobacterium magnum</i>	Králičí výkaly	Scardovi and Zani 1974	20222
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	Bachor skotu	Biavati and Mattarelli, 1991	6492
<i>Bifidobacterium minimum</i>	Odpadní vody	Biavati et al., 1982	20102
<i>Bifidobacterium mongoliense</i>	Kumys (alkoholický nápoj z kvašeného kobyliho mléka)	Watanabe et al., 2009	21395
<i>Bifidobacterium moukalabense</i>	Výkaly gorily nížinné (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	Tsuchida et al., 2014	27321

<i>Bifidobacterium myosotis</i>	Výkaly mlád'at kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i>)	Michelini et al., 2016	100196
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Stolice kojence	Scardovi et al., 1979	20438
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Bachor skotu	Yaeshima et al., 1992	20092
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Výkaly prasete	Yaeshima et al., 1992	20099
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	Slepé střevo prasete	Simpson et al., 2004	22366
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	Výkaly kuřat	Trovatelli et al., 1974	20433
<i>Bifidobacterium ramosum</i>	Výkaly tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i>)	Michelini et al., 2017	100688
<i>Bifidobacterium reuteri</i>	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	Endo et al., 2012	23975
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	Bachor skotu	Biavati and Mattarelli, 1991	6489
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	Výkaly králíka	Biavati et al., 1992	6531
<i>Bifidobacterium saguini</i>	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al., 2012	23967
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	Lidská krev	Hoyles et al., 2002	13734
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	Výkaly tamarína (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al., 2012	23968
<i>Bifidobacterium subtile</i>	Odpadní vody	Biavati et al., 1982	20096
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Výkaly selete	Zhu et al., 2003	17755
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	Výkaly prasete	Mitsuoka, 1969	20210
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	Výkaly mlád'at kosmanů (<i>Callithrix jacchus</i>)	Michelini et al., 2016	100201
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	Zubní plak křečka	Okamoto et al., 2008	17777

4.8.8 Kvantifikace bifidobakterií

Bifidobakterie je možné stanovit tradičními metodami kultivace na selektivních médiích. Jako selektivní faktor může být použito snížené pH nebo některá antibiotika. Pro odlišení rodu *Lactobacillus* od rodu *Bifidobacterium* je možné použít antibiotikum mupirocin. Laktobacily, které patří do skupiny bakterií mléčného kvašení, jsou na mupirocin citlivé, zatímco bifidobakterie jsou k tomuto antibiotiku rezistentní (Rada, 1997). Mupirocin byl po dlouhou dobu úspěšně používán jako selektivní faktor pro kvantifikaci a izolaci bifidobakterií. U fekálních vzorků je vhodné do média přidat ještě kyselinu octovou. V roce 2015 bylo navrženo doplnění média s mupirocinem o antibiotikum norfloxacin pro zvýšení jeho selektivity (Vlková et al., 2015).

4.8.9 Identifikace bifidobakterií

Základní identifikace na rodovou úroveň je důležitá pro odlišení bifidobakterií od ostatních sacharolytických bakterií přítomných v GIT živočichů, v mléčných výrobcích a dalších prostředcích (Orban and Patterson, 2000). V minulosti byly často využívány biochemické testy, založené na identifikaci pomocí fermentačních profilů, jejichž podstatou je schopnost jednotlivých kmenů zkvašovat určité cukry a jejich deriváty. Výsledky fenotypových identifikačních metod jsou často nejasné, časově náročné a obtížně reprodukovatelné (Ventura et al., 2004). Zároveň jsou získané fermentační profily základem fenotypové charakterizace a komerční kity jako API od společnosti BioMérieux (Francie) jsou používány při popisu nových druhů (Endo et al., 2012).

Nejjednodušším a nejpoužívanějším způsobem identifikace bifidobakterií na rodovou úroveň je důkaz přítomnosti enzymu fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy (F6PPK), který je klíčovým enzymem metabolismu těchto bakterií a je pro ně specifický (Scardovi, 1986). Další využívanou metodou rodové identifikace bifidobakterií je stanovení poměru acetátu a laktátu jako konečných produktů jejich metabolismu pomocí plynové chromatografie (Holdeman et al., 1977). V klasifikaci bakterií se velmi osvědčilo využívání analýzy sekvencí 16S ribozomální RNA, jejichž oblasti jsou druhově neměnné a mohou být použity ke srovnávání sekvencí různých bakteriálních druhů. Od genových sekvencí 16S rRNA je odvozeno velké množství oligonukleotidových sond a primerů, které umožňují spolehlivou identifikaci celé řady druhů bakterií (Langendijk et al., 1995).

Spolehlivou metodou rodové identifikace bifidobakterií je polymerázová reakce (PCR) s použitím rodově specifických primerů (Tannock, 2002). Metoda PCR (Polymerase chain

reaction) patří k nejvýznamnějším objevům molekulární genetiky, díky níž došlo ke zjednodušení a zlevnění analýz. Jedná se o *in vitro* metodu, při které se syntetizují úseky DNA, založené na replikaci nukleových kyselin. Díky PCR se získává velké množství specifických genů nebo jiných segmentů DNA, které mohou být dále využity (Madigan et al., 2015). Pro bifidobakterie lze použít také specifických primerů odvozených od 16S – 23S „spacer regionu“ (Tsai et al., 2008). Při práci s těmito metodami není nutná kultivace, lze využít možnosti detekce přímo ze vzorku. Jedná se o metodu rychlou, relativně jednoduchou a vysoce citlivou (Matsuki et al., 2003).

V posledních letech se stala jednou ze základních metod užívaných v bakteriální taxonomii hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice (MALDI MS). Výhodou této metody je rychlost provedení celé analýzy a schopnost rozlišení bakteriálních vzorků na požadovanou úroveň. MALDI-TOF MS poskytuje hmotnostní spektra části látek obsažených v bakteriální buňce, které jsou charakteristické pro analyzovaný rod, druh nebo kmen (Bunesova et al., 2017).

Další metodou je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která umožňuje přímou identifikaci čistých kultur nebo selektivní kvantifikaci bakteriálních buněk ve smíšené populaci jako je například mikrobiota střeva. FISH nevyžaduje kultivaci, což umožňuje kvantifikovat i mikroorganismy, které jsou obtížně kultivovatelné nebo nekultivovatelné, je vhodná i pro bifidobakterie (Takada et al., 2004). Podstatou je navázání specifické (rodově či druhově) fluorescenčně značené sondy na rRNA testovaného kmene bakterií. Po hybridizaci je vzorek analyzován epifluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií (Collado and Sanz, 2007).

4.8.1 Význam

Bifidobakterie jsou významné mikroorganismy, které jsou součástí střevní mikroflóry teplokrevných živočichů a hmyzu a příznivě ovlivňují zdraví hostitele. Nejvyšší počet bifidobakterií se nachází v trávicím traktu kojenců a mláďat na mléčné výživě, se stoupajícím věkem jejich počet klesá (Finegold et al., 1983). Bifidobakterie mají zásadní roli v různých biologických procesech jako je vývoj gastrointestinálního traktu, produkce hlenu, ochrana proti patogenům, funkce imunitního systému a podílí se na zpracování nestravitelných složek potravy (Ventura et al., 2012).

Bifidobakterie jsou díky svým probiotickým účinkům používány v mnohých výrobcích, jako jsou různé mléčné výrobky např.: jogurty, sýry, zakysané smetany, sušená mléka a další.

Nejčastěji se v probiotických produktech používají druhy *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. animalis* subsp. *lactis* (Bunesova et al., 2015).

4.8.2 Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy vyskytující se přirozeně v gastrointestinálním traktu člověka i zvířat, jejich podání v dostatečném množství má pozitivní účinek na zdraví hostitele a zlepšuje rovnováhu střevní mikroflóry (FAO/WHO, 2001). K tomu aby mohlo docházet k pozitivnímu působení, je nutné, aby tyto mikroorganismy po požití hostitelem prošly celým trávicím traktem až do střeva v nenarušeném stavu s vysokou vitalitou. V GIT musí odolávat nízkým hodnotám pH v žaludku, účinkům žlučových kyselin a působení trávicích enzymů. Používané probiotické mikroorganismy musí být všeobecně uznávané jako bezpečné a bez zdravotních rizik pro hostitele (Biavati et al., 2000).

Nejčastějšími probiotiky využívanými pro zvířata jako krmná aditiva jsou zejména grampozitivní bakterie *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bifidobacterium* sp. a *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp. a dále pak některé kvasinky *Saccharomyces* sp. a *Kluyveromyces* sp. a vláknité houby (Gaggia et al., 2010). Probiotické kmeny uvedených rodů jsou rovněž často používány v potravinách a potravinových doplňcích pro humánní výživu (Bunesova et al., 2015). Minimální množství denní konzumace by mělo činit alespoň 10^6 probiotických bakterií v 1 g. Jedná se především o bakterie, které jsou složkou potravy nebo doplňků stravy (Socol et al., 2010). Probiotika produkují látky, jako například organické kyseliny, peroxid vodíku aj., kterými inhibičně působí na některé druhy grampozitivních i gramnegativních bakterií, a tak vedou ke stabilizaci střevní mikroflóry. Snižují počty živých buněk nežádoucích bakterií a také ovlivňují metabolismus bakterií a produkci toxinů (Vernazza et al., 2006).

Mechanismus působení probiotik v těle hostitele je založeno na přichycení probiotických organismů na střevní epitel. Probiotické bakterie obsadí přilnavá místa na epitelu a zablokují je, v důsledku toho se nemohou patogenní bakterie ve střevě usadit. Střevní mikroflóra je v přímém kontaktu s epitelárními buňkami střeva a tím stimuluje imunitní systém. Probiotika účinně navozují imunitní účinky a stabilizují střevní slizniční bariéry (Saarela et al., 2000).

4.8.3 Prebiotika

Prebiotika jsou definovány jako nestravitelné složky potravin, které pozitivně ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu bakteriálních druhů v tlustém střevě. Jedná se zejména o

bifidobakterie a laktobacily, které mají potenciál zlepšovat zdraví hostitele (Tanaka et al., 1983). Přestože jsou prebiotika odvozena od stravitelné vlákniny, ne každá vláknina je prebiotikum. Prebiotika způsobují změny ve střevních mikrobiálních společenstvech a stimulují růst prospěšných střevních mikrobů (Johnson-Henry et al., 2014). Příkladem běžně používaných prebiotik přidávaných do potravin a krmiv pro zvířata jsou galakto-oligosacharidy (GOS) nacházející se v lidském mateřském mléce a frukto-oligosacharidy (FOS) přítomné v různých potravinách včetně chřestu, pórků a cibule (Vandenplas et al., 2015). Fruktooligosacharidy jsou štěpeny enzymem fruktosidázou, kterou produkují především bifidobakterie a laktobacily. Tím fruktooligosacharidy potlačují růst patogenních mikroorganismů. Byl zjištěn nárůst populace rodu *Bifidobacterium* sp. po podávání fruktooligosacharidů v množství 1 až 20 g za den (Lindsay et al., 2006). FOS jsou připravené částečným štěpením inulinu a GOS jsou připravené z laktózy pomocí glykosylační aktivity β -galaktosidázy. Jejich účinek se může lišit podle toho, jakým způsobem byla prebiotika vyrobená (Fooks and Gibson, 2002).

Ačkoliv existuje řada studií, které neprokázaly žádné nežádoucí účinky při používání prebiotik, některé studie uvádí, že užívání prebiotik ve vysokých dávkách může vyvolat nadýmání, bolesti břicha, zvýšené pohyby střev nebo změnu konzistence stolice (Marteau and Seksik, 2004).

4.8.4 Synbiotika

Termín synbiotikum byl primárně uváděn jako prospěšný produkt, který kombinuje prebiotika a probiotika, a v němž prebiotické sloučeniny selektivně upřednostňují probiotické kmeny (Schrezenmeir et al., 2001). Několik studií prokázalo pozitivní synergické účinky synbiotik na obezitu, diabetes, nekrotizující enterokolitidu a na další nemoci organismu (Asemi et al., 2014; Dilli et al., 2015). Nejjednodušším příkladem synbiotik je jogurt s obsahem probiotických bifidobakterií a prebiotickou oligofruktózou. Kombinace těchto dvou složek přispívá k prodloužení přežití probiotika. Synbiotika mohou být také preparáty ve formě kapslí, uvnitř kterých jsou probiotické bakterie obalené v materiálu obsahující prebiotikum (Rada, 2011).

5 Metodická část a materiál

5.1 Odběr vzorků

Do skleněné zkumavky s bujónem bylo odebráno malé množství (přibližně 1 g, velikosti lískového ořechu) čerstvé stolice. Odebrání stolice bylo provedeno pomocí přiložené sterilní tyčinky, která byla po odběru vyhozena. Odběr byl proveden ihned po vykonání potřeby zvířete, aby byl vzorek co nejčerstvější. Zkumavka byla uzavřena a její obsah byl opatrně promíchán, tak aby byl celý vzorek ponořen do tekutiny. Nedoporučuje se míchat příliš intenzivně, vzorek by se mohl promíchat se vzduchem, což by nebylo vhodné anaerobní bakterie trávicího traktu. Je důležité dbát, aby nedošlo k vylití bujónu a aby nebyl smazán číselný údaj na zkumavce. Zkumavka s odebraným vzorkem byla následně zamrazena. Vzorky byly označeny a bylo zaznamenáno, o jaký druh zvířete se jedná (stáří, pohlaví, aj.).

5.2 Použité vzorky

Pro tuto práci bylo použito 9 vzorků stolice získaných od 7 různých druhů kočkodanů ze zoologických zahrad v České Republice (Zoo Liberec, Zoo Olomouc, Zoo Dvůr Králové, Zoo Hodonín). Seznam všech použitých vzorků a druhů kočkodanů je uveden níže.

Tabulka č. 2 – Seznam použitých vzorků

Číslo primáta	Druh zvířete	Latinský název	Zoo	Datum odběru
PR21	Kočkodan Dianin	<i>Cercopithecus diana</i>	Liberec	15.06.2017
PR29	Kočkodan husarský	<i>Erythrocebus patas</i>	Olomouc	20.07.2017
PR34	Kočkodan husarský	<i>Erythrocebus patas</i>	Olomouc	20.07.2017
PR36	Kočkodan Campbellův	<i>Cercopithecus campbelli</i>	Dvůr Králové	06.09.2017
PR37	Kočkodan bělonosý	<i>Cercopithecus nictitans</i>	Dvůr Králové	06.09.2017
PR38	Kočkodan talapoin	<i>Miopithecus talapoin</i>	Dvůr Králové	07.09.2017
PR39	Kočkodan Brazzův	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Liberec	25.10.2017
PR45	Kočkodan husarský	<i>Erythrocebus patas</i>	Olomouc	10.10.2017
PR52	Kočkodan zelený	<i>Chlorocebus sabaeus</i>	Hodonín	09.03.2018

5.3 Použitá média pro detekci bifidobakterií

Ke zjištění přítomnosti a počtu bifidobakterií byla použita 2 různá média. Jednalo se o agary: Wilkins-Chalgren agar s přidavkem kyseliny octové a mupirocinu (WSP), již zmíněný modifikovaný WSP agar navíc s norfloxacinem (Bif-NORF).

Příprava agaru začíná rozpuštěním Wilkins-Chalgren agaru v destilované vodě s přidáním sójového peptonu, cysteinu a tweenu. Vše je potřeba dobře rozmíchat, rozvařit a sterilovat. Po vytemperování na 48 °C je přidán mupirocin, kyselina octová a směs je opět promíchána. Pro modifikovaný agar je postup i složení stejné, jen je přidán mupirocin a norfloxacin.

Tabulka č. 3 – Složení médií pro růst bifidobakterií

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
Wilkins-Chalgren (WSP) Mup agar pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	48 h, anaerobní, při 37 °C	43 g Wilkins-Chalgren anaerob agar (OXOID), 5 g Sójový pepton (OXOID), 0,5 g Cystein (OXOID), 1 ml Tween (Sigma), 100 mg Muporocin, 100 µl ledová kys. octová
Modifikovaný agar s norfloxacinem (Bif-NORF pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	48 h, anaerobní, při 37 °C	43 g Wilkins-Chalgren anaerob agar (OXOID), 5 g Sójový pepton (OXOID), 0,5 g Cystein (OXOID), 100 mg Muporocin, 1 ml Tween (Sigma) 1 g Norfloxacin, 100 µl ledová kys. octová

5.4 Rozbor

Pro rozbor vzorků byla připravena ředící řada (2. – 9. ředění). Jednalo se o anaerobně připravené zkumavky s bujónem (9 ml/ zkumavka). Odběrová skleněná zkumavka se vzorkem (1. ředění) byla zvážena před a po vložení vzorku, aby bylo možné z rozdílů hodnot vypočítat množství vzorku, které inkuluje do 2. ředění. Následně byl z každého ředění odebrán injekční stříkačkou 1 ml média a vložen do další zkumavky ředící řady. Po vytvoření ředící řady byl

z každé lahvičky odebrán 0,5 ml média, který byl přenesen do nadepsaných Petriho misek. Médium bylo zalito agarem a vše se nechalo anaerobně kultivovat po dobu 48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.

Narostlé kolonie v Petriho miskách byly spočítány pomocí počítadla a celkový počet byl vynásoben číslem 2 (jelikož pro kultivaci byly použity malé Petriho misky a inokulační dávka je 0,5 ml a ne 1 ml). S každým vyšším ředěním by měl být počet kolonií zhruba 10x nižší. Výpočtem byly získány počty bakterií, tedy počet kolonie tvořících jednotek v 1 g vzorku stolice (KTJ/ 1g stolice). Níže je uveden vzorec pro výpočet.

Při vyhodnocení rozboru byly pomocí digitálního počítadla spočítány narostlé kolonie. Konečné množství bakterií bylo vypočteno podle následujícího vztahu (viz níže), výsledkem byl vyjádřen přesný počet kolonií tvořících jednotek v 1 g stolice.

$$P = [(P1 + P2) / 11] * F \text{ (KTJ/g)}$$

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

F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

KTJ – kolonie tvořící jednotka

Narostlé kolonie s rozdílnými kultivačními charakteristikami (barva, tvar, struktura kolonie) byly sterilně odebrány bakteriologickou kličkou z Petriho misek a byly vloženy do zkumavek s tekutým médiem WSP. Tímto byl vytvořen izolát, který se nechal dále kultivovat 24 hodin opět při 37 °C.

Z narostlého izolátu bylo odebráno injekční stříkačkou malé množství média s narostlou kulturou na podložní sklíčko, přikryto krycím sklíčkem a sledováno ve světelném mikroskopu s fázovým kontrastem. Pro další testování a identifikaci bylo zapotřebí mít pouze čisté kultury bifidobakterií, tedy jednotné kultury nepravidelných tyčinek bez jakýchkoliv jiných mikroorganismů např. koků, laktobacilů, kvasinek apod. Mikroskopické pozorování probíhalo pod zvětšením 400x a u každého preparátu byl pořízen digitální snímek.

Poté bylo provedeno přeočkování, tedy odebrání 0,5 ml média do nové zkumavky s médiem WSP. Pokud byla ve vzorku čistá kultura bifidobakterií, byl z každého vzorku odebrán 1 ml média s narostlou kulturou do dvou sterilních zkumavek (1,5 ml; Eppendorf). Přičemž jedna zkumavka byla dále použita pro izolaci DNA, druhá pro identifikaci MALDI-TOF MS.

5.5 Izolace DNA

Zkumavky s 1 ml bakteriální suspenze byly centrifugovány v centrifuze rychlostí 14500 otáček/min po dobu 3 minut. Ze zkumavky byl opatrně odlit supernatant a ponechán pouze sediment. Sediment byl resuspendován 100 μ l roztokem PrepMan Ultra (Life Technologies). Suspenze byla zahřáta v termobloku na 100 °C po dobu 10 minut. Následně byla suspenze ponechána v pokojové teplotě po dobu 2 minut. Suspenze byla opět centrifugována v centrifuze rychlostí 14500 otáček/min po dobu 3 minut. Po stočení bylo ze zkumavky odpipetováno 50 μ l supernatantu do nové sterilní zkumavky (1,5 ml; Eppendorf). Izolovaná DNA byla poté skladována v mrazáku a byla tak připravena pro pozdější testování.

5.6 MALDI-TOF MS (extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí)

Pro MALDI-TOF MS byl bakteriální sediment resuspendován 500 μ l 70% ethanolu. Eppendorf zkumavky byly centrifugovány po dobu 3 minut při max. otáčkách, následně byl odlit a odpipetován přebytečný ethanol, zůstal pouze sediment. K sedimentu bylo přidáno 25 μ l 70% kyseliny mravenčí a 25 μ l acetylnitrilu. Suspenze byla zvortexována (promíchána) a opět stočená v centrifuze. Posléze byl 1 μ l ve dvou kopiích napipetován na speciální destičku (Bruker). Na závěr byla na destičku přidána matrice, mezi dvě kopie byly rozděleny 2 μ l. Tím byly vzorky připraveny k identifikaci a vloženy do přístroje.

5.7 Test na detekci enzymu F6PPK

1. Narostlé kultury (3 ml) převést do centrifugačních zkumavek a nechat stočit
2. Stočené kultury slít, peletu opláchnout v roztoku 1
3. Přidat 100 μ l CTAB, kultivovat 5 minut
4. Přidat 62,5 μ l roztoku 2 a 100 μ l roztoku 7, nechat 30 minut kultivovat ve vodní lázni při 37 °C
5. Přidat 375 μ l roztoku 3, kultivovat 10 minut
6. Přidat 250 μ l roztoku 4, 5, 6

Po přidání roztoku 6 se zkumavky s přítomností bifidobakterií zbarví do fialova, ty bez bifidobakterií se nezbarví.

Tabulka č. 4 - Složení použitých činidel

Název činidla	Složení
Roztok 1	0,36 g K ₂ HPO ₄ , 0,10 g KH ₂ PO ₄ , 0,15 g cysteinu, 300 ml H ₂ O
Roztok 2	120 mg NaF, 200 mg Na-iodoacetátu, 20 ml H ₂ O
Roztok 3	4,17 g hydroxylaminu, 30 ml H ₂ O (pH 6,5 – upravit 2 ml 40% NaOH)
Roztok 4	3 g TCA (trichloroctové kyseliny), 20 ml H ₂ O
Roztok 5	2,48 ml HCl, 17,52 ml H ₂ O
Roztok 6	1 g FeCl ₃ , 62 µl HCl, 20 ml H ₂ O
Roztok 7	290 mg fruktosa-6-fosfátu, 5,5 ml H ₂ O
CTAB	detergent cetridium bromidu (45 mg/100 ml H ₂ O)

5.8 Identifikace získaných izolátů bifidobakterií

Vlastní identifikace izolátů byla provedena sekvenací genu 16S rRNA pracovníky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, a to Věrou Neužilo Bunešovou a Nikol Modráčkovou. Z izolované DNA byla připravena polymerázová řetězová reakce (PCR) s použitím univerzálních primerů (285F a 261R) pro 16S rRNA. Získaný PCR produkt byl zkontrolován a vizualizován pomocí gelové elektroforézy a následně purifikován. Purifikovaný produkt byl zaslán k sekvenování do GATC Biotech (Německo). Výsledky byly poté analyzovány programy Chromas a BioEdit. Získaná sekvence byla porovnána s typovými sekvencemi uloženými v databázi Blast.

6 Výsledky

Celkově byl proveden rozbor u devíti vzorků kočkodanů, jednalo se celkem o 7 druhů - kočkodan Dianin (Zoo Liberec), kočkodan husarský (Zoo Olomouc), kočkodan Campbellův (Zoo Dvůr Králové), kočkodan bělonosý (Zoo Dvůr Králové), kočkodan talapoin (Zoo Dvůr Králové), kočkodan Brazzův (Zoo Liberec) a kočkodan zelený (Zoo Hodonín). Pomocí kultivačních médií určených pro rod *Bifidobacterium* byly ze vzorků stanoveny počty bakterií, jednalo se o médium WSP Mup agar a více selektivní Bif-NORF.

V následující tabulce jsou znázorněny stanovené počty detekovaných bakterií ze vzorků výkalů kočkodanů. Výsledky jsou vyjádřeny jako logaritmus počtu kolonie tvořících jednotek v 1 g vzorku (log KTJ/g).

Tabulka č. 5 – Přesné počty bifidobakterií, získané ze vzorků kočkodanů

Číslo primáta	Druh zvířete	Izolace	Zoo	Počty bakterií log KTJ/g		Izoláty n
				BIF-MUP	BIF-NORF	
PR21	Kočkodan Dianin	Vzorek z výběhu	Liberec	6,50	6,24	8
PR29	Kočkodan husarský	Vzorek z výběhu	Olomouc	6,33	2,60	6
PR34	Kočkodan husarský	Vzorek z výběhu	Olomouc	7,80	7,93	6
PR36	Kočkodan Campbellův	Vzorek z výběhu	Dvůr Králové	6,65	3,50	8
PR37	Kočkodan bělonosý	Vzorek z výběhu	Dvůr Králové	5,46	3,57	6
PR38	Kočkodan talapoin	Vzorek z výběhu	Dvůr Králové	6,70	5,39	7
PR39	Kočkodan Brazzův	Vzorek z výběhu	Liberec	7,40	4,86	8
PR45	Kočkodan husarský	Vzorek z výběhu	Olomouc	7,13	7,28	6
PR52	Kočkodan zelený	Vzorek z výběhu	Hodonín	6,45	4,15	4
Průměr				6,71	5,06	
Směrodatná odchylka				0,68	1,81	

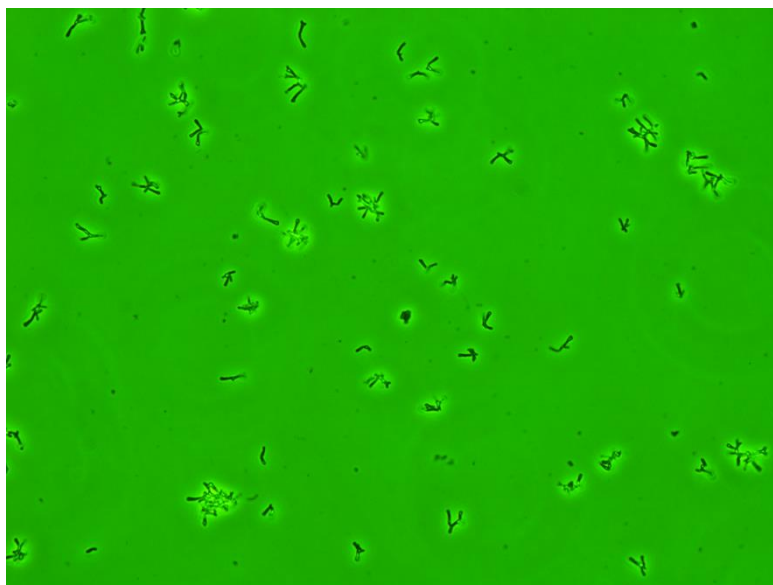
Bylo zjištěno, že počet bifidobakterií se u kočkodanů pohyboval v rozmezí 5,46 - 7,8 log KTJ na 1 g stolice pokud šlo o kultivaci na médiu BIF-MUP, kdežto na médiu obohacené o

norfloxacin byly počty nižší, pohybovaly se v rozmezí 2,6 – 7,93 log KTJ/g. Nejvyšší počty stanovené na norfloxacinu byly u kočkodana husarského s hodnotou 7,93 KTJ/g, nejnižší pak opět u kočkodana husarského s hodnotou 2,6 KTJ/g. Průměrný počet bifidobakterií na médiu BIF-MUP byl 6,71 a na médiu BIF-NORF 5,06 log KTJ/g. Přesné počty jsou uvedeny v tabulce číslo 5.

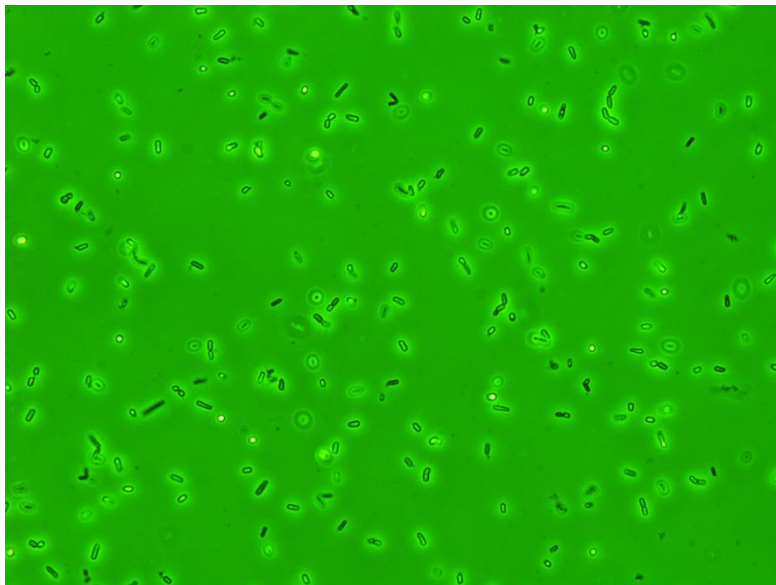
Na základě izolace a identifikace bifidobakterií bylo zjištěno, že mezi izoláty z média BIF-MUP byly častěji přítomny jiné mikroorganismy než bifidobakterie, což se odráželo v získaných počtech. Počty byly vyšší, protože médium není tolik selektivní v porovnání s průměrnými počty na BIF-NORF, kde byly počty o 2 – 3 řády nižší. Počet izolátů se pohyboval v rozmezí 4 – 8, jelikož bylo snahou získat co nejvariabilnější kolonie.

Jednalo se o zástupce rodu *Clostridium* a *Sarcina*. Přítomnost těchto bakterií byla patrná již během izolace. Při práci s izoláty, kdy se nejednalo o bifidobakterie, se tvořil plyn, zápach a pod mikroskopem s fázovým kontrastem byla patrná odlišná morfologie. Bifidobakterie tvořily typické útvary ve formě nepravidelných tyčinek, zatímco klostridie byly typické pravidelné, silnější tyčinky, vytvářející spóry. U sarcin se jednalo o shluky koků tvořící krychlové útvary, které se také shlukovaly.

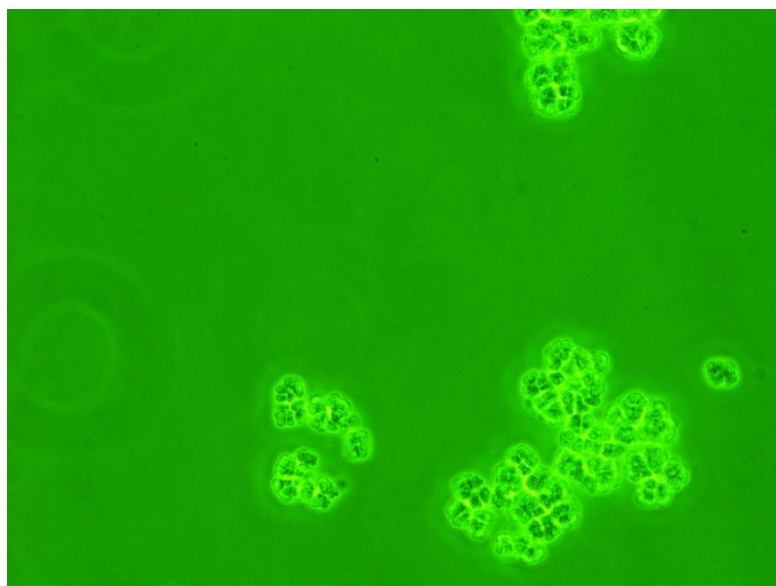
Obrázek č. 4 – Čistá kultura *Bifidobacterium angulatum*



Obrázek č. 5 – *Clostridium* sp.



Obrázek č. 6 – *Sarcina* sp.



Pomocí testu na detekci enzymu F6PPK byly bifidobakterie identifikovány na rodovou úroveň a sekvenace genu 16S rRNA byla použita pro jejich přesnější identifikaci na úroveň druhu. V metodice je také uvedena metoda identifikace MALDI-TOF MS. Uvedená metoda byla použita jen několikrát, jelikož se hojně stávalo, že se izoláty nepodařilo identifikovat, jelikož dané druhy nebyly v databázi.

Bylo zjištěno, že bifidobakterie se vyskytovaly u 5 testovaných druhů kočkodanů a to u kočkodana Dianina, kočkodana husarského, kočkodana Campbellova, kočkodana bělonosého a kočkodana zeleného. Zatímco u kočkodana talapoina a kočkodana Brazzova se bifidobakterie nepodařilo detekovat. Pomocí sekvenace byly izoláty bifidobakterií identifikovány jako druhy *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. asteroides*, *B. animalis* subsp. *lactis* a *Alloscardovia* sp. Jedná se o druhy, které jsou typické pro trávicí trakt člověka i dalších zvířecích hostitelů, tedy multi-hostitelské druhy. Kromě *B. asteroides*, kdy se jedná o druh typický pro hmyz se sociálním způsobem života.

U kočkodana Dianina se podařilo izolovat *B. angulatum* a *B. pseudocatenulatum*. U kočkodana husarského byl izolován druh *B. asteroides*, *B. angulatum* a *Alloscardovia* sp. Izoláty identifikované jako rod *Alloscardovia* sice nepatří mezi bifidobakterie, ale náleží do stejné čeledi *Bifidobacteriaceae*. Dále se podařilo identifikovat *B. animalis* subsp. *lactis* u kočkodana Campbellova a bělonosého, který je typickým multi-hostitelským druhem. A u kočkodana zeleného byl identifikován druh *B. angulatum*.

Tabulka č. 6 – Výsledky F6PPK testu

Číslo primáta	Druh zvířete	F6PPK, morfologická identifikace	Identifikace izolátů bifidobakterií
PR21	Kočkodan Dianin	BIF	<i>B. angulatum</i> (5), <i>B. pseudocatenulatum</i> (3)
PR29	Kočkodan husarský	Sarciny, klostridie	<i>B. asteroides</i> (2)
PR34	Kočkodan husarský	BIF	<i>B. angulatum</i> (6)
PR36	Kočkodan Campbellův	BIF , klostridie	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (2)
PR37	Kočkodan bělonosý	BIF , klostridie	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (2)
PR38	Kočkodan talapoin	Klostridie	Bez bifidobakterií
PR39	Kočkodan Brazzův	Sarciny, klostridie	Bez bifidobakterií
PR45	Kočkodan husarský	BIF	<i>B. angulatum</i> (3), <i>Alloscardovia</i> sp. (3)
PR52	Kočkodan zelený	BIF , Sarcina	<i>B. angulatum</i> (2)

7 Diskuze

Trávicí trakt savců je osídlen celou řadou mikroorganismů, jenž mají zásadní vliv na zdraví jedince. Složení mikrobioty představuje značné rozdíly napříč živočišnými druhy, a také v různých oddílech trávicího traktu (Bunešová et al., 2014). Hostitel poskytuje přítomným bakteriím vhodné podmínky pro růst, jako jsou živiny a stabilní prostředí.

Bifidobakterie patří do skupiny probiotických bakterií, které jsou přirozenými obyvateli gastrointestinálního traktu savců i hmyzu, ale nacházejí se také v potravinách jako sýry, mléčné produkty aj., dále pak v odpadních vodách nebo v lidské vagíně (Bunešová et al., 2014). Je možné je izolovat z výkalů, z bachoru dobytka, ze zubního kazu a plaku, dále pak z medu a včelího zažívacího traktu (Felis and Dellaglio, 2007). U hmyzu byly bifidobakterie zaznamenány u druhů, žijících především sociálním způsobem života jako jsou například včely, vosy, švábi a čmeláci (Kopečný et al., 2010). U obratlovců je osídlení trávicího traktu rozmanitější. Mnoho druhů bifidobakterií není hostitelsky specifická a mohou se vyskytovat u více druhově rozdílných živočichů (Bunešová et al., 2014). Jejich největší koncentrace je v tlustém střevě mláďat v období mléčné výživy (Kim et al., 2011).

V nedávné době bylo popsáno mnoho nových druhů bifidobakterií z gastrointestinálního traktu primátů. V roce 2010 bylo izolováno 5 atypických kmenů bifidobakterií z výkalů kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) a tamarína žlutorukého (*Saguinus midas*). Na základě podrobnějších rozborů bylo stanoveno 5 nových druhů: *B. reuteri*, *B. callitrichos*, *B. saguini*, *B. stellenboschense* a *B. biavatii* (Endo et al., 2012). O dva roky později byl objeven a popsán nový druh izolovaný z výkalů gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) nazvaný *B. moukalabense* (Tsuchida et al., 2014). Z výkalů mláďete kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) byly získány další nové taxony: *B. myosotis*, *B. tissieri* a *B. hapali*. V roce 2015 byl objeven druh *B. lemurum*, získaný z výkalů lemura kata (*Lemur catta*) (Modesto et al., 2015). Po sléze v roce 2016 byly objeveny druhy *B. aerophilum*, *B. avesanii* a *B. ramosum*, které byly izolované z trávicího traktu tamarína pinčího (*Saguinus oedipus*), dále pak *B. eulemuris* získaný z výkalů lemura černého (*Eulemur macaco*) (Michelini et al., 2016). Všechny zmíněné nové druhy bifidobakterií pocházejí z jedinců žijících v přirozeném nebo alespoň částečně přirozeném prostředí. Naopak ve výkalech orangutana a šimpanze chovaných v zoologické zahradě byly objeveny druhy *B. adolescentis* a *B. dentium*, které jsou typické pro člověka (D'Aimmo et al., 2014).

Tato bakalářská práce je zaměřená na zvířata chovaná v lidské péči v zoologických zahradách. Je zřejmé, že i přesto že se ošetřovatelé snaží co nejvíce zvířatům napodobit potravu získávanou ve volné přírodě, někdy to není zcela možné. Proto mají zvířata chovaná v lidské péči odlišné složení mikrobioty oproti zvířatům žijících volně (Campbell, 2015).

Celkem bylo zkoumáno 9 fekálních vzorků od 7 druhů kočkodanů, konkrétně od kočkodana husarského, kočkodana Dianina, kočkodana Campbellova, kočkodana zeleného, kočkodana bělonosého, kočkodana talapoina a kočkodana Brazzova, pocházejících z různých zoologických zahrad. Podařilo se izolovat bifidobakterie z trávicího traktu 5 zkoumaných druhů kočkodanů. Kdy byly nalezeny druhy *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum* u kočkodana Dianina, *B. angulatum* a *B. asteroides* u kočkodana husarského, *B. animalis* subsp. *lactis* u kočkodana Campbellova a kočkodana bělonosého a *B. angulatum* u kočkodana zeleného. Nepodařilo se izolovat žádný z nově popsáných druhů.

Izolované druhy *B. angulatum* a *B. pseudocatenulatum* jsou druhy typické pro trávicí trakt člověka (Ventura et al., 2004), nicméně se vyskytují i u jiných živočichů. Podařilo se izolovat *B. animalis* subsp. *lactis*, který je multi-hostitelským druhem (Bunesova et al., 2017). U druhu *B. asteroides* je diskutabilní, zda se jedná o druh, který kolonizuje trávicí trakt kočkodana nebo zda se jedná o kontaminaci z potravy, jelikož je typický pro hmyz se sociálním způsobem života, jako jsou například již zmíněné včely, vosy (Kopečný et al., 2010). To je pravděpodobně způsobeno tím, že je hmyz součástí jejich stravy. Nicméně je zajímavé, že jeho detekce se opakovala.

V bakalářské práci bylo použito kultivační stanovení na selektivních agarech, jednalo se o médium WSP Mup agar a více selektivní Bif-NORF. Jednalo se o modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přidavkem sójového peptonu, cysteinu, tweenu, mupirocinu a ledové kyseliny octové, který byl doplněný o antibiotikum mupirocin (BIF-MUP) nebo kombinaci mupirocinu a norfloxacinu (Bif-NORF). Bifidobakterie byly z celkových počtů anaerobů zjištěny v průměrných hodnotách 6,71 log KTJ na 1 g stolice pokud šlo o kultivaci na médiu BIF-MUP a 5,06 log KTJ/g na médiu obohacené o norfloxacin. Médium s norfloxacinem navržené Vlková et al. (2015) bylo shledáno skutečně jako více selektivní, ale i přes vyšší selektivitu na něm narostly i jiné rody bakterií. Jednalo se o druhy, které jsou řazeny mezi potenciálně patogenní, jako rod *Sarcina* (Bunešová et al., 2016) a *Clostridium* (Songer, 2010). Nicméně, výsledky ukazují, že v přítomnosti bifidobakterií byly počty těchto bakterií eliminovány.

8 Závěr

Rod *Bifidobacterium* je v současné době zajímavým tématem pro výzkum. Tato práce je zaměřena na porovnání výskytu bifidobakterií u kočkodanů chovaných v zoologických zahradách a u primátů žijících volně v přírodě.

Bifidobakterie byly identifikovány pomocí testu na detekci enzymu F6PPK a sekvenace genu 16S rRNA. Na základě výsledků bylo zjištěno, že se bifidobakterie vyskytovaly u 5 ze 7 testovaných druhů kočkodanů, jednalo se o druhy - kočkodan Dianin, kočkodan husarský, kočkodan Campbellův, kočkodan bělonosý a kočkodan zelený. Zatímco u kočkodana talapoina a kočkodana Brazzova se bifidobakterie nepodařilo detekovat. Pomocí sekvenace byly identifikovány druhy - *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. asteroides*, *B. animalis* subsp. *lactis* a *Alloscardovia* sp.

Byla potvrzena hypotéza práce, a to že se v mikrobiotě kočkodanů držených v zoologických zahradách podařilo identifikovat spíše multi-hostitelské druhy bifidobakterií.

9 Seznam použité literatury

- Asemi, Z., Khorrami-Rad, A., Alizadeh, S. A., Shakeri, H., Esmailzadeh, A. 2014. Effects of synbiotic food consumption on metabolic status of diabetic patients: A double-blind randomized cross-over controlled clinical trial. *Clin. Nutr.*, 33, 198–203.
- Bauchop T. 1971. Stomach microbiology of primates. *Annu. Rev. Microbiol.* 25: p. 429-436.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of microbiology*, 50(2), 117-132.
- Bunesova, V., Killer, J., Javurkova, B., Vlkova, E., Tejnecky, V., Musilova, S., Rada, V., 2017. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Anaerobe* 44, 40-47.
- Bunesova, V., Musilova, S., Geigerova, M., Pechar, R., Rada, V. 2015. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 106-109.
- Bunešová V., Drnková B., Vlková E.: Opportunistic pathogen *Sarcina ventriculi* [Opportunní patogen *Sarcina ventriculi*.] *Medicína pro praxi*, 13 (2), 64-67, 2016.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Killer, J., Musilová, Š. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*.
- Campbell, L., 2015. The Mystery Writers of America Cookbook: Wickedly Good Recipes from Lee Child, Mary Higgins Clark, Harlan Coben, Nelson DeMille, Gillian Flynn, Sue Grafton, Charlaine Harris, James Patterson, Louise Penny, Scott Turow, and Other Acclaimed Plot Stirrers. *Library Journal* 140, 127-127.
- Collado, M. C., Sanz, Y., 2007. Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by the use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques. *Veterinary Microbiology* 121, 299-306.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International journal of food microbiology* 149(1). 4-18.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati, B., Andlid, T., 2014. Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe* 30, 169-177.
- De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzoti M., Poullet JB., Massart S. et al. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14691-14696.
- Dilli D, Aydin B, Fettah ND, Ozyazici E, Beken S, Zenciroglu A, Okumus N, Ozyurt BM, Ipek MS, Akdaq A, et al. 2015. The ProPre-Save study: effects of probiotics and prebiotics alone or combined on necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr*, 166:545–51, e1.
- Disotell, T. R., 2003. Primates: Phylogenetics. *Encyclopedia of the Human Genome*. Nature Publishing Group, London.
- Doleyres Y., Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*. 15. 973-988.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Schumann, P., Pukall, R., Dicks, L. M. T. 2012. *Bifidobacterium reuteri* sp. nov., *Bifidobacterium callitrichos* sp. nov., *Bifidobacterium saguini* sp. nov.,

Bifidobacterium stellenboschense sp. nov. and *Bifidobacterium biavatii* sp. nov. isolated from faeces of common marmoset (*Callithrix jacchus*) and red-handed tamarin (*Saguinus midas*). Systematic and Applied Microbiology, 35, 92-97.

Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Schumann, P., Pukall, R., Dicks, L. M. T., 2012. Systematic and Applied Microbiology 35, 92-97.

FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, joint fao/who expert consultation. cordoba, argentina, 1 - 4 october 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, p. 34.

FELIS, G. E., DELLAGLIO, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. Curr Issues Intest Microbiol 8:2, p. 44-61.

Finegold, S. M., Sutter, V. L., Mathisen, G. E. 1983. Normal Indigenous Intestinal Flora. Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Academic Press. New York. NY. USA. 3–31.

Fooks, L. J., Gibson, G., R. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition. 88 (1). 39–49.

FUQUAY J. W., FOX P. F., McSWEENEY P. L. H., 2011: Encyclopedia of dairy sciences. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 4170 s. ISBN 978-0-12-374407-4.

Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology 141, Supplement, S15-S28.

Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

Groves, C. P., Napier, J. R. 2017. Primate - Mammal [online]. Encyclopaedia Britannica. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z <<https://www.britannica.com/animal/primate-mammal/Introduction>>

Holdeman, L. V., Cato, E. P., Moore W. E. C.: Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburh: 1-156,1977.

Chivers, D. M., and C. M. Hladik. 1980. Morphology of the gastrointestinal tract in primates: comparison with other mammals in relation to diet. J. Morphol. 116:337-386.

Isolauri E., Salminen S., Ouwehand AC. 2004. Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 18:299-313.

Johnson-Henry KC, Pinnell LJ, Waskow AM, Irrazabal T, Martin A, Hausner M, Sherman PM. 2014. Short-chain fructo-oligosaccharide and inulin modulate inflammatory responses and microbial communities in Caco2-bbe cells and in a mouse model of intestinal injury. J Nutr, 144:1725–33.

Kim, H. B., Borewicz, K., White, B. A., Singer, R. S., Sreevatsan, S., Tu, Z. J., Isaacson, R. E. 2011. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the faeces of commercial pigs. Veterinary Microbiology. 153. 124-133.

Klappenbach, L. Old World Monkeys [online]. ThoughtCo. 17. 2. 2016 [cit. 2018-03-11]. Dostupné z <thoughtco.com/old-world-monkeys-130648>

Kopečný, J., Mrázek, J., Killer, J. 2010. The presence of Bifidobacteria in Social Insects, Fish and Reptiles. Folia Microbiologica. 55. 336-339.

- Kumar, A. 2003. Animal physiology. Discovery publishing house. India. p. 72. ISBN: 81-7141-744-2.
- Langendijk, P. S., Schut F., Jansen G.J., Raangs G.C., Kanphuis G.F., Wilkinson M.F., Welling G.W. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 61, 3069-3075.
- Lindsay, J. O., K. Whelan, A. J. Stagg, P. Gobin, H. O. Al-Hassi, N. Rayment, M. A. Kamm, S. C. Knight and A. Forbes, 2006. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*, 55, 348-355.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. 2015. Brock biology of microorganisms (14th ed.). Boston, MA: Pearson Education.
- Marteau P, Seksik P. 2004. Tolerance of probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol*; 38:S67-9.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., 2003. Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 4, 61-69.
- Maus, J. E. Ingham, S. C., 2003. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid- tolerance of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology.* 95. 146-154.
- MAXA V., RADA V. 2002. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. 2nd ed. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 42 s. ISBN 80-85120-57-7.
- Michelini, S., Modesto, M., Filippini, G., Spiezio, C., Sandri, C., et al., 2016. Systematic and Applied Microbiology 39, 229-236.
- MODESTO, M., MICHELINI, S., STEFANINI, I., SANDRI, C., SPIEZIO, C., PISI, A., FILIPPINI, G., BIAVATI, B. and MATTARELLI, P. 2015. *Bifidobacterium lemorum* sp. nov., from faeces of the ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65, 1726-1734.
- Myers, P. 2000. Primates [online]. Animal Diversity Web. [cit. 2018-03-11]. Dostupné z <<http://animaldiversity.org/accounts/Primates/>>
- Myers, P., Espinosa, R., Parr, C. S., Jones, T., Hammond, G. S., Dewey, T. A. 2018. Cercopithecidae – Old World monkeys [online]. The Animal Diversity Web. [cit. 2018-03-11]. Dostupné z <<https://animaldiversity.org/accounts/Cercopithecidae/classification/#Cercopithecidae>>
- Orban, J. I., Patterson, J.A., 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 40, 221-224.
- Pokusaeva, K., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. 2009. Characterization of two novel alpha-glucosidases from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* 75. 1135-1143.
- RADA, V. (1997), Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing. *Biotechnology Techniques* 11:12, p. 909-912.
- Rada, V. 2011. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze. *Medicína pro praxi.* 8 (1). 1-4.

- Rafferty, J. P. 2013. Vervet [online]. Encyclopaedia Britannica. [cit. 2018-03-11]. Dostupné z <<https://www.britannica.com/animal/vervet>>
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F a Stanton, C., 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 149: 88-105.
- SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84:3, p. 197-215.
- Scardovi V. 1986. Genus *Bifidobacterium* Orla – Jensen 1924. In: Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2. Williams and Wilkins, Baltimore. 1418 – 1434.
- SCHINDLER, J., 2014: Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2nd ed. Praha: Grada Publishing, 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
- Schrezenmeir, J., de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-Approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 361s–364s.
- Simpson JM, Martineau B., Jones WE, Ballam JM, Mackie RI. 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb Ecol.* 44:186-97.
- Socol, R., C., Souza, L., P., Spier, M., R., Medeiros A., B., P., Lindner, J., D. 2010. The Potential of Probiotics. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (4). 413–434.
- Songer, J.G. Clostridia as agents of zoonotic disease (2010) *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4), pp. 399-404.
- Takada, T., Matsumoto, K., Nomoto, K., 2004. Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *Journal of Microbiological Methods* 58, 413-421.
- Tanaka R, Takayama H, Morotomi M, Kuroshima T, Ueyama S, Matsumoto K, Kuroda A, Mutai M. 1983. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora* 2, 17–24.
- Tannock GW. 1995. Normal mikroflora. An introduction to microbes inhabiting the human body. London: Chapman and Hall.
- TANNOCK, G. W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Molecular Biology* 1:1, p. 53-64.
- Tannock, G. W. (ed) 2002. Probiotics and Prebiotics – where are we going? p. 333, IBT Global, Norfolk, England.
- Tsai, C. C., Lai, C. H., Yu, B., Tsen, H. Y., 2008. Use of specific primers based on the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) region for the screening *Bifidobacterium adolescentis* in yogurt products and human stool samples. *Anaerobe* 14, 219-223.
- Tsuchida, S., Takahashi, S., Nguema, P. P. M., Fujita, S., Kitahara, M., Yamagiwa, J., Ngomanda, A., Ohkuma, M., Ushida, K. 2014. *Bifidobacterium moukalabense* sp. nov., isolated from the faeces of wild west lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64. 449-455.
- Turroni F, Feroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P et al. (2009a). Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 75: 1534–1545.

Vandenplas Y, Zakharova I, Dmitrieva Y. 2015. Oligosaccharides in infant formula: more evidence to validate the role of prebiotics. *Br J Nutr.* 113:1339–44.

Ventura, M., Sinderen, D. van, Fitzgerald, F. G., Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology.* 86. 205- 223.

Ventura, M., Turrioni, F., Motherway, MO., MacSharry, J., van Sinderen, D. 2012. Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends Microbiol* 20: 467-476.

VERNAZZA, C. L., RABIU, B. A., GIBSON, G. R. 2006. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: introduction to prebiotics. In *Prebiotics: development and application.* Rastall, B., Gibson, G. (Eds.). p. 264.

Vlková, E., Salmonová, H., Bunešová, V., Geigerová, M., Rada, V., Musilová, T. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe*, 34, pp. 27-33.

VORÍŠEK K., 1989: Probiotika a gastrointestinální mikroflóra. Praha: Vysoká škola zemědělská Praha, 111 s.

Waddington, L., Cyr, T., Hefford, M., Hansen, L. T., Kalmokoff, M. 2010. Understanding the acid tolerance response of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 108. 1408–142.

Yatsunenکو T., Rey FE., Manary MJ., Trehan O., Dominguez-Bello MG., Contreras M. et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222-227.

Použití obrázky:

Bottacini, F., van Sinderen, D., Ventura, M. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *Biochemical Journal*, 474 4137-4152. [obrázek]. 2017. [cit. 2018-02-16].

Dery B. Internal anatomy of a monkey. [obrázek]. 2016. [cit. 2017-11-8]. Dostupné z <<https://infovisual.info/en/biology-animal/internal-anatomy-of-a-monkey>>

McIlroy S.J., Saunders A.M., Albertsen M., Nierychlo M., McIlroy B., Hansen A.A., Karst S.M., Nielsen J.L., Nielsen P.H. MiDAS: The field guide to the microbes of activated sludge. [obrázek]. 2015. [cit. 2018-03-16]. Dostupné z <http://www.midasfieldguide.org/en/search/bacteria_02/actinobacteria/actinobacteria/bifidobacteriales/bifidobacteriaceae/bifidobacterium/bifidobacterium_02.htm?#;sid=34|13>