

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Bifidobakterie trávicího traktu exotických zvířat

Bakalářská práce

Autor práce: Tereza Máčalíková

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

Konzultant: Ing. Věra Bunešová, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Bifidobakterie trávicího traktu exotických zvířat" jsem vypracoval(a) 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 autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil(a) autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.4. 2016

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D, za perfektní spolupráci a cenné rady, které mi velice pomohly k sepsání mé bakalářské práce.

Bifidobakterie trávicího traktu exotických zvířat

Souhrn

Literární rešerše bakalářské práce se zabývá osídlením gastrointestinálního traktu bifidobakteriemi u exotických druhů zvířat a hmyzu. Byl popsán výskyt bifidobakterií, střevní mikrobiota a její funkce. Dále se zabývá odlišnostmi mikrobioty trávicího traktu býložravců, všežravců, následuje charakteristika rodu *Bifidobacterium* a popis pozitivních účinků tohoto rodu na zdravý jedince.

Cílem praktické části bylo kultivační stanovení a rodová identifikace probiotických bakterií ve vzorcích výkalů 4 druhů zvířat, konkrétně fretky domácí, nosála červeného, morčete domácího a lišky polární. Z odebraných vzorků byly získány izoláty, u kterých byla provedena mikroskopická kontrola a test na aktivitu enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa, který je specifický pro bifidobakterie, čímž byla provedena rodová identifikace.

Výsledkem práce bylo zjištění, že bifidobakterie se nacházely pouze ve vzorcích dvou analyzovaných zvířat, a to od všežravého nosála červeného a býložravého morčete domácího. Počty bifidobakterií u těchto dvou jedinců se pohybovaly v rozmezí hodnot od 7,43 do 8,07 log KTJ/g. U masožravých jedinců, fretky domácí a lišky polární, nebyly bifidobakterie zaznamenány. Laktobacily byly detekovány u všech zvířat a jejich počty byly velmi variabilní (od 3,46 do 8,08 log KTJ/g). Nízké počty bifidobakterií, nebo jejich absence, je typická pro masožravce, jejich vyšší zastoupení lze očekávat u mláďat, která jsou krmena mateřským mlékem.

Klíčová slova: střevní mikrobiota, bifidobakterie, výživa, savci, hmyz

Bifidobacteria of intestinal tract of exotic animals

Summary

The main topic of literature review of my bachelor thesis was description of occurrence of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of exotic animals and insect. First part contains a description of an occurrence of bifidobacteria, the intestinal microbiota and its functions. Next part is dedicated to differences of intestinal tract of herbivores, omnivores and is followed by characteristics of genus *Bifidobacterium* and a description of positive effects of bifidobacteria on animal health.

The goal of the practical part was the determination and genus-level identification of probiotic bacteria in feces samples of 4 animal species, domestic ferret, south american coati, guinea pig and arctic fox. After the bacteria cultivation on selective agars, isolates were collected and identified by microscopy and detection of the enzyme fructose-6-phosphate phosphoketolase, which is specific for bifidobacteria.

Bifidobacteria were found just in two samples from analyzed animals, from omnivorous south american coati and herbivorous guinea pig. The numbers of bifidobacteria in this two animals varied from 7,43 to 8,07 log CFU/g. In samples of carnivorous animals, domestic ferret and arctic fox, the bifidobacteria were not found. Lactobacilli were found in all samples of animals and their count varied from 3,46 to 8,08 log CFU/g. Low numbers of bifidobacteria, or their absence, is typical for carnivorous animals. Higher counts could be expected in samples of animals, which are fed with breastmilk.

Keywords: intestinal microbiota, bifidobacteria, nutrition, mammals, insect

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	9
3.1	Vymezení pojmu „Exotické zvíře“	9
3.2	Výskyt bifidobakterií a popis střevní mikrobioty	9
3.2.1	Funkce střevní mikrobioty	11
3.2.2	Odlišnosti mikrobioty trávicího traktu býložravců a všežravců	12
3.3	Charakteristika rodu <i>Bifidobacterium</i>	13
3.3.1	Vlastní charakteristika bifidobakterií	13
3.3.2	Pozitivní účinky bifidobakterií na zdraví jedince	16
3.4	Bifidobakterie u bezobratlých živočichů	17
3.4.1	Včely (rod <i>Apis</i>)	17
3.4.2	Čmeláci (rod <i>Bombus</i>)	18
3.5	Bifidobakterie u exotických druhů obratlovců	19
3.5.1	Kosman bělovousý (<i>Callithrix jacchus</i>)	20
3.5.2	Tamarín žlutoruký (<i>Saguinus midas</i>)	21
3.5.3	Lemur kata (<i>Lemur catta</i>)	22
3.5.4	Slon indický (<i>Elephas maximus</i>)	23
3.5.5	Panda velká (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	24

3.5.6	Gorila nížinná (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>).....	24
4	Metodika	27
4.1	Mikrobiologický rozbor vzorků výkalů	27
4.1.1	Popis zvířat a jejich výživy.....	27
4.1.2	Odběr vzorků a mikrobiologický rozbor	28
4.2	Identifikace bakterií.....	29
4.2.1	Rodová identifikace bifidobakterií.....	30
5	Výsledky	32
5.1	Počty bakterií ve vzorcích výkalů zvířat	32
5.2	Identifikace izolovaných bifidobakterií a laktobacilů	33
6	Diskuze	38
7	Závěr	44
8	Seznam použité literatury	45

1 Úvod

Osídlení trávicího traktu zvířat a lidí je rozdílné. Odhaduje se, že savčí mikrobiota gastrointestinálního traktu je složena z 500 až 1000 bakteriálních druhů, a právě bakterie jsou nejpočetnější skupinou.

Bifidobakterie jsou součástí přirozeného osídlení trávicího traktu. Nalézají se napříč trávicím soustavou a jejich četnost je rozdílná v různých částech zažívacího ústrojí. Obecně lze říci, že kaudálním směrem se množství bakterií zvyšuje. Výskyt bifidobakterií je žádoucí ve vysokém počtu, poněvadž mají hlavně pozitivní vliv na zdraví hostitele. Struktura mikrobioty se během života mění. Nejpočetnější výskyt bifidobakterií je u mláďat savců po porodu v období mléčné výživy. Počet bifidobakterií s narůstajícím věkem klesá. Nejen věk, ale i strava hostitele ovlivňuje bakteriální rozmanitost. Bakteriální diverzita trávicího traktu se zvyšuje od masožravců přes všežravce až po býložravce. U býložravců je střevní mikrobiota nejrozmanitější. Dalším faktorem ovlivňujícím složení mikrobioty jedince je prostředí, ve kterém se zvířata nacházejí. Rozdílné složení mikrobioty má jedinec žijící v přirozeném místě výskytu, a jedinec, žijící například v zoologické zahradě.

Obecně mohou bifidobakterie sloužit jako léčba, ale hlavně jako prevence gastrointestinálních poruch zažívacího traktu. Složení střevní mikrobioty lze pozitivně ovlivnit podáváním probiotik, prebiotik nebo synbiotik.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je vytvořit literární přehled, který se bude zabývat druhovým zastoupením bifidobakterií v mikrobiomu různých zvířat se zvláštním důrazem na exotické savce a hmyz. Dále bude popsána úloha probiotických bakterií v trávicím traktu a vliv výživy na jejich zastoupení. Cílem praktické části bude stanovení bifidobakterií ve vzorcích výkalů různých druhů zvířat.

3 Literární rešerše

3.1 Vymezení pojmu „Exotické zvíře“

Obecně platí, že je málo dostupných informací o přítomnosti bifidobakterií u exotických zvířat a u volně žijících živočichů vůbec. Pojem exotické zvíře lze definovat jako zvíře, které nežije v České republice ve volné přírodě, je neobvyklé, cizokrajné, a proto nápadné. V ČR, i jiných zemích, kde jsou alochtonní, tato zvířata můžeme najít v zoologických zahradách, zooparcích či zájmových chovech. Pokud žijí v ČR ve volné přírodě, tak je to výjimka, k níž došlo únikem ze soukromého chovu nebo úmyslným vypuštěním. Jedná se především o zástupce z podkmene obratlovců.

Tato bakalářská práce se zabývá i bifidobakteriemi trávicího traktu hmyzu, protože jejich výskyt je charakteristický pro trávicí trakt zejména savců a jejich přítomnost u hmyzu není zcela typická.

3.2 Výskyt bifidobakterií a popis střevní mikrobioty

Bifidobakterie jsou součástí přirozené mikrobioty GIT (gastrointestinální trakt) lidí, ostatních savců, ale i jiných zvířat. Nalézají se napříč trávicím traktem a jejich četnost je v různých částech trávicího traktu mění. Jejich výskyt ve vysokém počtu je žádoucí a je spojován s dobrým zdravím hostitele (Bunešová et al., 2014).

Výskyt bifidobakterií není omezen pouze na trávicí trakt teplokrevných živočichů a lidí, najdeme je také ve střevě čmeláků a včel, potravinách jako jsou mléko a sýry, ale také například v odpadních vodách (Bunešová et al., 2014). Kromě trávicího traktu mohou být také součástí vaginální mikrobioty nebo zubního plaku (Ventura et al., 2007).

Vývoj mikrobioty trávicího traktu začíná okamžikem porodu. Původně sterilní trávicí trakt mláděte je osidlován přirozenou mikrobiotou matky a následně i mikroorganismy z prostředí. Struktura mikrobioty se v průběhu života mění. Zpočátku je silně ovlivněna způsobem porodu a prostředím kde porod probíhá. Následně je formována prostředím a nejbližším okolím mláděte, jelikož mláďata savců přicházejí do styku s matčinými výkaly, s kůží a bakterie jsou přijímány i během sání mléka. Trávicí trakt těsně po porodu obsahuje kyslík, proto první mikroorganismy, které kolonizují trávicí trakt savců, jsou fakultativně anaerobní bakterie. Během 24 hodin jsou nahrazeny striktně anaerobními bakteriemi mezi nimiž dominují bifidobakterie. Bifidobakterie jsou nejpočetnější skupinou bakterií u většiny mláďat hospodářských zvířat v období mléčné výživy. Přirozená kolonizace pozitivně působícími bakteriemi je omezena, pokud jsou mláďata brzy odebrána od svých matek a jsou ustájena individuálně. Díky tomu se zvyšuje riziko průjmových onemocnění u mláďat jako následek nerovnováhy ve složení GIT mláděte. Po ukončení mléčné výživy se formuje mikrobiota dospělého jedince, která se vyvíjí v závislosti na různorodé expozici okolního prostředí. Odhaduje se, že savčí mikrobiota trávicího traktu je složena z 500 až 1000 bakteriálních druhů (Kim et al., 2011). GIT savců obsahuje bakterie, archea, plísně, prvoky a viry (Suchodolski et al., 2011). Avšak bakterie jsou nejpočetnější a nejvíce metabolicky aktivní skupinou. V lidské střevní mikrobiotě převládají po šestém měsíci věku, kdy se vyvíjí stabilní střevní mikrobiota dospělého typu, bakterie kmenů Bacteroidetes a Firmicutes, poměrně běžné jsou i bakterie kmene Verucomicrobia. Nízké počty jsou pak nalézány u kmene Proteobacteria (Geigerová et al., 2014).

Díky velkým projektům jako například Human microbiome project a Metagenomics of the Human Intestinal Tract byly definovány tři základní skupiny lidských střevních mikrobiomů, tzv. enterotypy. Enterotypy jsou nazývány podle skupiny bakterií, které dominují v daném mikrobiomu a dají se také předurčit podle druhu diety. Enterotyp Bacteroides je spojován s dietou západních zemí, která je charakteristická vysokým obsahem bílkovin a tuků v potravě. Naopak enterotyp Prevotella mívají lidé, kteří konzumují vysoký

podíl rostlinné stravy. Posledním enterotypem je enterotyp Ruminococcus, který se nedá předurčit podle diety. (Voreades et al., 2014).

Osídlení trávicího traktu není celý život stejné. Se zvyšujícím věkem dochází ke změnám v počtu, složení a funkci střevní mikrobioty. Klesá počet některých bakteriálních rodů (*Bifidobacterium* sp., *Bacteroides* sp.), které mají ochrannou funkci. Dále se s přibývajícím věkem zvyšuje počet bakterií patřící do kmene Bacteroidetes (Mariat et al., 2009). Ale spíše než věk ovlivňují bakteriální složení mikrobioty dieta, okolní prostředí, nadváha nebo gastrointestinální onemocnění (O'Connor et al., 2014). U savců převažují bakterie kmenů Firmicutes a Bacteroidetes (Palmer et al., 2007).

3.2.1 Funkce střevní mikrobioty

Mikroorganismy v trávicím traktu mají různé funkce, které mohou být rozděleny na funkce metabolické, imunologické a fyziologicko-anatomické. Mikroorganismy v tlustém střevě získávají energii většinou ze sacharidů, které nejsou stráveny v tenkém střevě. Toho je dosaženo pomocí fermentace za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a jiných produktů. Nejvýznamnější z nich jsou kyselina octová, propionová a máselná. Produkce SCFA příznivě ovlivňuje metabolismus glukózy a lipidů v játrech. Přítomnost kyselin s krátkým řetězcem snižuje pH v tlustém střevě, a tak vzniká nevhodné prostředí pro patogenní bakterie. Kyselina máselná je navíc využívána jako zdroj energie pro enterocyty. Fermentace nestrávených sacharidů bakteriemi zlepšuje absorpci některých prvků, jako například vápníku, hořčíku, zinku a železa, v tlustém střevě. Mezi další funkce mikrobioty GIT patří i stimulace produkce střevního hlenu, udržení střevní integrity a stimulace střevní angiogeneze. Střevní mikrobiota se podílí na vývoji a průběžné stimulaci imunity. Nejcitlivějším obdobím pro ovlivnění mikrobioty jedince je období po narození. Zdravá střevní mikrobiota osidluje povrchy sliznic a brání tak uchycení a pomnožení patogenních mikroorganismů (Hooper and Macpherson, 2010).

3.2.2 Odlišnosti mikrobioty trávicího traktu býložravců a všežravců

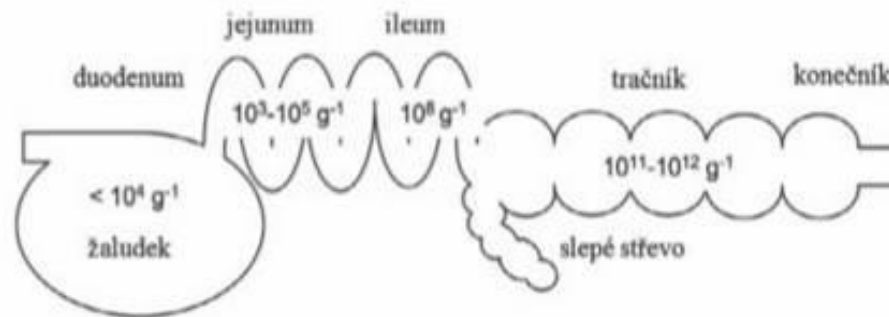
Mikro- a makroorganismy se spolu vyvíjejí více než miliardu let. Jedná se o jeden z nejsložitějších ekosystémů, jenž je průběžně ovlivňován faktory, které souvisejí s hostitelem nebo vnějším prostředím. Nejen původ, ale i strava hostitele ovlivňuje bakteriální rozmanitost. Bakteriální diverzita trávicího traktu se zvyšuje od masožravců přes všežravce až po býložravce. U býložravců je střevní mikrobiota nejrozmanitější (Ley et al., 2008).

Savci nemají enzymy, jenž by umožňovaly trávení celulózy a dalších komplexních sacharidů, které jsou základním stavebním kamenem rostlinné stravy, tuto funkci zastupují bakteriální enzymy. Musela být prodloužena doba trávení, aby byl poskytnut dostatečný čas pro činnost mikrobiálních enzymů. Toho bylo docíleno prodloužením části GIT nebo koprofágií. K prodloužení trávicího traktu došlo dvěma způsoby. Prvním způsobem bylo prodloužení části GIT před žaludkem (přední trávení). Druhou možností bylo prodloužení GIT za žaludkem (zadní trávení). Suchozemští býložravci mají rozmanitější gastrointestinální mikrobiotu víc než všežravci nebo masožravci. Obecně nejbohatší střevní mikrobiotu ze všech savců mají mořští býložravci (Nelson et al., 2013).

Největší rozdíl v trávení je mezi monogastry a přežvýkavci. U přežvýkavců je nejprve potrava fermentována mikroorganismy v bachoru a až poté trávena v tenkém a tlustém střevě. Enzymatické trávení zvířete nastupuje až po fermentaci a jsou jím stráveni prvoci a bakterie, zatímco u monogastrů probíhá hlavní fermentace až v tlustém střevě. Nedochozí k trávení mikroorganismů, protože mikrobiální fermentaci potravy předchází její trávení enzymy hostitele. V bachoru jsou nejvíce zastoupeny bakterie kmenů Firmicutes a Bacteroidetes, v minoritním množství jsou bakterie kmenů Proteobacteria, Actinobacteria a Tenericutes (Jami and Mizhari, 2012).

Kaudálním směrem se množství bakterií zvyšuje. V tlustém střevě u monogastrických zvířat převažují bakterie kmenů Firmicutes a Bacteroidetes. Ostatní kmeny jako Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Spirochaetes a Cyanobacteria jsou v intestinálním traktu v menším počtu (Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013). Tlusté střevo se skládá ze slepého střeva, tračníku a konečníku a jeho morfologie se liší u různých druhů zvířat v závislosti na typu přijímané potravy. U všech savců je obsah tlustého střeva fermentován přítomnými bakteriemi, tento proces je nejintenzivnější u nepřežvýkavých býložravců. K

fermentaci dochází v tračnίκu a slepém střevě. Potrava, která vyžaduje delší fermentační proces, obvykle vstupuje do slepého střeva, i když je slepé střevo slabě vyvinuto. Významně mají vyvinuto slepé střevo například koně, prasata a hlodavci. V intestinálním traktu savců se kaudálním směrem snižuje pH. Pokles pH v tračnίκu a slepém střevě lze připsat k rozsáhlé bakteriální fermentaci a vzniku těkavých mastných kyselin (Godoy-Vitorino et al., 2012).



Obr. 1: Znázornění počtu bakterií v jednotlivých částech trávicího traktu monogastrických savců (Geigerová et al., 2014).

Bylo také prokázáno, že složení střevní mikrobioty se liší u zvířete žijícího v zajetí ve srovnání se zvířetem stejného druhu, které žije ve volné přírodě. Jedná se o důsledek výše zmíněných faktorů (Nelson et al., 2012).

3.3 Charakteristika rodu *Bifidobacterium*

3.3.1 Vlastní charakteristika bifidobakterií

Rod *Bifidobacterium* je klasifikován jako jediný zástupce čeledi Bifidobacteriaceae, z řádu Bifidobacteriales, podtřídy Actinobacteridae, třídy Actinobacteria, kmen Actinobacteria, říše Bacteria (Biavati and Mattarelli, 2012). V současnosti bylo v rámci rodu *Bifidobacterium* identifikováno 51 druhů a poddruhů, z nichž 33 druhů bylo izolováno z výkalů zvířat (Bunešová et al., 2014).

Bifidobakterie jsou grampozitivní, acidorezistentní, nesporulující a nepohyblivé bakterie. Buňky bifidobakterií mají proměnlivou délku, mohou být krátké i poměrně dlouhé. Jedná se o nepravidelné tyčinky se špičatými konci, na buňkách se mohou objevovat drobné výčnělky, mohou být různě ohnuté až větvené. Buňky mají tvar písmene V nebo Y, ale může se vyskytnout i hvězdčovitě uspořádání buněk. Vyskytují se jednotlivě nebo v řetězcích. Kolonie jsou většinou pravidelné, krémové nebo bílé barvy, lesknou se a jsou jemné konzistence. Jsou striktně anaerobní, ale některé druhy, jako *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Bifidobacterium scardovii* a *Bifidobacterium tsurumiense*, mohou růst za aerobních podmínek. Optimální teplota pro růst je 37-41 °C, minimální teplota je 25-28 °C, maximální teplota je 43-45 °C. Hranice 45 °C se zdá být hraniční pro rozlišení lidských a zvířecích kmenů, protože většina zvířecích, je schopna růst i při takové teplotě. Optimální pH pro počáteční růst je 6,5-7,0. Nerostou při pH menší než 4,5-5,0 nebo nad pH 8,0-8,5. (Biavati and Mattarelli, 2012).

Buněčná stěna bifidobakterií obsahuje bílkovinu peptidoglykan, kyselinu teichovou či lipoteichovou a sacharidy, např. galaktosu, glukosu a často i rhamnosu (Lauer a Kandler, 1983). Bílkoviny a kyselina lipoteichová jsou zodpovědné za hydrofóbní charakter povrchu bifidobakterie a také umožňují přichycení k povrchu střevních buněk hostitele. Vliv teploty na biosyntézu proteinů buněčné stěny a odolnost vůči vodě byl studován na *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*. Produkce bílkovin buněčné stěny je závislá na teplotě. Za nízké teploty se produkce snižuje, přičemž za střední a vysoké teploty roste produkce bílkovin. Buněčné stěny těchto organismů se liší v tloušťce. Pohybuje se přibližně od 0,2 µm do 0,05 µm pro *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* a *Bifidobacterium thermophilum* (Kudo et al., 1989).

Nezbytnou složkou pro růst bifidobakterií jsou dusíkaté látky, které získávají z aminokyselin (např. alanin, valin nebo kyselina aspartamová) nebo asimilací amoniaku. Další látkou potřebnou k životu jsou uhlíkaté látky. U bifidobakterií to mohou být mono-, di-, ale nejčastěji oligosacharidy, které jsou pro bifidobakterie zdrojem energie. Oligosacharidy se dostávají při průchodu trávicím traktem až do tlustého střeva, které je osídleno právě bifidobakteriemi. Oligosacharidy můžeme rozdělit na fruktooligosacharidy (FOS), sójové oligosacharidy, galaktooligosacharidy (GOS) a oligosacharidy mateřského mléka (Biavati and Mattarelli, 2012).

Kratší řetězce polysacharidů než inulin se nazývají fruktooligosacharidy (FOS). FOS jsou složeny z D-fruktózových jednotek v lineárním řetězci spojených β (2-1) vazbami. Fruktooligosacharidy se dají vyrábět i průmyslově. První možností výroby je hydrolysa inulinu, takto vyrobené FOS se nazývají oligofruktosy, druhou možností je syntéza ze sacharosy, pak jsou FOS nazývány neocukry. FOS vytváří řetězce různé délky, bifidobakterie snadněji metabolizují kratší řetězce (Ventura et al., 2007).

Galaktooligosacharidy se skládají z jedné jednotky glukosy, na kterou jsou navázány galaktosy vazbou α (1-4) a jsou vzájemně propojené vazbou β (1-6). Právě díky β -konfiguraci jsou GOS odolné vůči štěpení slinami a žaludečními šťávami (Zhong et al., 2009). GOS jsou průmyslově vyráběny z laktosy transgalaktosylací za současného účinku β -galaktosidasy. Tímto způsobem vyrobené galaktooligosacharidy se nazývají transgalaktosylované oligosacharidy (TOS). GOS živočišného původu se nacházejí v lidském a kravském mléce. Bylo zjištěno, že bifidobakterie a laktobacily fermentují GOS primárně, to znamená, že GOS mají bifidogenní účinek (Macfarlane et al., 2008).

Sójové oligosacharidy (SOS) bývají také označovány jako oligosacharidy rafinosové řady. Skládají se především z trisacharidu rafinosy a pentasacharidu verbaskosy. Dále je tam značné zastoupení galaktosy, podobně jako v GOS. Přirozeně se vyskytují v luštěninách, ze kterých jsou získávány extrakcí. Je dokázáno, že mají bifidogenní účinek (Touhy et al., 2005).

Další látkou, která podporuje růst bifidobakterií je lactoferrin. Bifidobakterie v sobě shromažďují železo, které je v redukovaném stavu a nachází se v anaerobních podmínkách trávicího traktu. Bifidobakterie vyváží železo z prostředí, čímž znemožní jeho využití patogenními bakteriemi a zamezí tak jejich růstu (Biavati and Mattarelli, 2012).

Pro kultivaci bifidobakterií jsou v neposlední řadě potřeba vitaminy skupiny B (např. B5 a B3) a vitaminy skupiny K. Bylo zjištěno, že bifidobakterie mohou syntetizovat vitaminy skupiny B (B1 thiamin, B3 niacin, B6 pyridoxin, B11 kyselina listová) (Cronin et al., 2011).

3.3.2 Pozitivní účinky bifidobakterií na zdraví jedince

Bifidobakterie mají hlavně pozitivní vliv na zdraví hostitele. Jejich zdravotní přínosy jsou léčba a prevence gastrointestinálních poruch a udržení zdraví trávicího traktu, zmírnění intolerance na laktózu, odolnost vůči mikrobiálním infekcím, ochrana před patogeny, zvýšení imunitního systému, prevence rakoviny a snížení hladiny cholesterolu (Biavati and Mattarelli, 2012). Složení střevní mikrobioty lze pozitivně ovlivnit různými způsoby, mezi než patří podávání probiotik, prebiotik nebo synbiotik.

3.3.2.1 Probiotika

Termín probiotikum (Parker, 1974) je výraz znamenající „pro život“. Ihned byl tento výraz použit pro označení bakterií, které mají prospěšné účinky pro lidi i zvířata. Současná, ale pravděpodobně ne poslední, je definice probiotik jako „živých mikroorganismů“, které poskytují hostiteli zdravotní přínos jako přirození obyvatelé trávicího traktu. Vhodné je podávat probiotika jako doplněk stravy ve stresujících obdobích, po podávání antibiotik a u zvířat držených v zajetí zejména období odstavu, začátku laktace nebo při změně krmné dávky (Biavati and Mattarelli, 2012). Jako probiotické bakterie ve výživě lidí se nejčastěji používají bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Pro hospodářská zvířata se podávají nejčastěji bakterie rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* nebo kvasinky rodu *Saccharomyces* (Gaggia et al., 2010).

3.3.2.2 Prebiotika

Další metodou jak zvýšit počet zdraví prospěšných bifidobakterií v trávicím traktu je přidání prebiotických látek do stravy. Prebiotika jsou definovaná jako „nestavitelná složka potravy, která příznivě ovlivňuje růst a aktivitu bakterií v tlustém střevě, které zlepšují zdraví hostitele“. Podporují růst zdraví prospěšných bakterií (hlavně bifidobakterií a laktobacilů). FOS a GOS jsou nejvíce oblíbenými prebiotiky (Biavati and Mattarelli, 2012).

3.3.2.3 Synbiotika

Jedná se o kombinaci prebiotika a probiotika. Prebiotikum by mělo selektivně podporovat růst a aktivitu použitého probiotika. Díky oné kombinaci obou složek se zlepšuje osídlování a kolonizace dodaných probiotických bakterií (De Preter et al., 2011).

3.4 Bifidobakterie u bezobratlých živočichů

Přítomnost bifidobakterií byla zaznamenána v trávicím traktu většiny zástupců hmyzu se sociálním způsobem života. Znamená to, že jedinci žijí společně v koloniích, které se většinou skládají z jednotlivých kast. Hlavní postavení má samice královna, která má jedinou funkci, a to plození potomstva. Dále se společenstvo skládá ze samců, kteří se páří s královnou, vojáků a dělnic. Všichni společně se starají o potomstvo a zimu většinou přežívá jen královna. Patří sem především včely, vosy, švábi a čmeláci. U švábů se nejčastěji vyskytuje druh *B. adolescentis* (Kopečný et al., 2010), který se běžně vyskytuje i v trávicím traktu lidí (Bunešová et al., 2014).

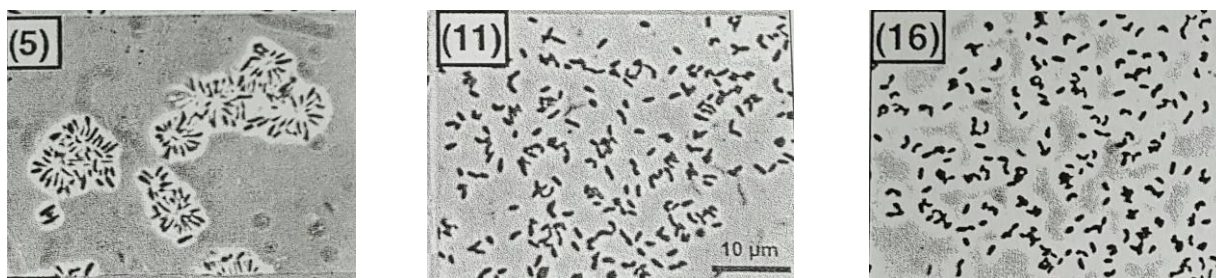
3.4.1 Včely (rod *Apis*)

Včela medonosná (*Apis mellifera*) není zcela domestikovaný hmyz, který se chová ve včelínech pro produkci medu k lidské spotřebě a pro opylování hospodářských plodin. Existuje mnoho poddruhů. V jižní Africe se vyskytuje například ve dvou poddruzích: včela medonosná kapská (*A. mellifera capensis*) a včela medonosná středoafriká (*A. mellifera scutellata*). V Evropě žije *A. mellifera mellifera*, která má rozmanité osídlení trávicího traktu. Z grampozitivních bakterií mohou být v trávicím traktu nalezeny např. rod *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium* a z gramnegativních bakterií např. *Escherichia coli*, *Enterobacter* či *Pseudomonas* (Jeyaprasath et al., 2003).

U včel je přítomnost bifidobakterií všeobecně známá. Počet bifidobakterií se pohybuje okolo 2-8 % ze všech bakterií v trávicím traktu. Nejčastějším druhem je u včel

Bifidobacterium indicum, dále *B. asteroides* či *B. coryneforme* (obr. 2), jedná se o druhy hostitelsky specifické, které dosud nebyly nalezeny nikde jinde (Kopečný et al., 2010).

B. asteroides vytváří typické hvězdicovité shluky. Pro kultivaci vyžaduje přítomnost CO₂ a optimální teplota pro růst je 35-36 °C. *B. indicum* byla pojmenována podle typického hostitele včely medonosné indické *Apis cerana indica*. Podobně jako u *B. asteroides* je k růstu vyžadována přítomnost CO₂ (Biavati and Mattarelli, 2012).



Obr. 2: Morfologie buněk *B. asteroides* (5), *B. coryneforme* (11), *B. indicum* (16), (Biavati and Mattarelli, 2012)

3.4.2 Čmeláci (rod *Bombus*)

Další část práce se bude podrobněji zabývat bifidobakteriemi u čmeláků, jelikož přítomnost bifidobakterií v trávicím traktu čmeláků je poměrně novou informací.

Čmeláci patří mezi běžný blanokřídlý hmyz a jsou ekologicky velice důležití. Je dobře známo, že jsou důležitými opylovači mnoha rostlin. Spolu se včelami jsou řazeni do kmene Apidae, řád Hymenoptera. Díky jejich dlouhému sosáku (proboscis), jsou schopni opylovat rostliny, které nemohou být opylovány včelami. Celý rod *Bombus* patří mezi sociální hmyz, kde je uplatněna reprodukční dělba práce. Sbírají nektar a vytvářejí med stejně jako včely, ale ne v takovém množství (Killer et al., 2010).

Všechny druhy hmyzu mají v trávicím traktu širokou škálu mikroorganismů, každá skupina hmyzu má odlišné složení, jelikož mají jiné stravovací návyky. Čmeláci mají podobné osídlení trávicího traktu bakteriemi jako včely, ale jsou tam také některé odlišnosti (Killer et al., 2010).

U tří druhů čmeláků (*Bombus lucorum*, *Bombus pascuorum*, *Bombus lapidarius*) bylo zjištěno, že laktobacily se nacházely ve všech vzorcích v počtech od 7,0 do 8,7 log CFU/g, což je nižší počet než u včel. Také bylo zjištěno, že v zažívacím traktu čmeláků se nachází více anaerobních než fakultativně anaerobních bakterií. Mikrobiota trávicího traktu včel a čmeláků se skládá z rozličných bakteriálních druhů. U čmeláků nalezneme bakterie mléčného kvašení (např. *Lactobacillus bombi*, *L. kunkeei*, *L. johnsonii*, *Fructobacillus fructosus*) a bifidobakterie (*Bifidobacterium actinocoloniiforme*, *B. bohemicum* a *B. bombi*) (Killer et al., 2010).

Praet et al. (2013) klasifikovali nový druh *Bifidobacterium commune* při izolaci vzorků trávicího traktu *Bombus lapidarius* v Ghentu, Belgie. *Bifidobacterium commune* je grampozitivní, nepohyblivá bakterie protáhlého rozvětveného tvaru. Kolonie mají bílou nebo béžovou barvu, jsou kulaté a lesklé. Růst byl pozorován po 48 hodinách na polotuhém pěstebném médiu při 37 °C za anaerobních podmínek.

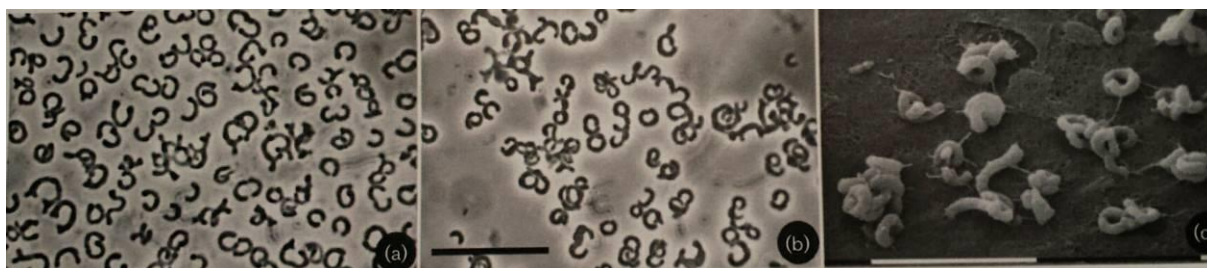
3.5 Bifidobakterie u exotických druhů obratlovců

Všeobecně lze říci, že celkové složení mikrobioty zvířete závisí především na potravě a podmínkách prostředí, ve kterém se zvíře nachází. Zcela odlišné složení mikrobioty má volně žijící jedinec oproti jedinci chovanému v lidské péči. Nejen, že zvíře se nachází v jiném prostředí než je přirozené místo výskytu, setkává se s jinými uměle chovanými zvířaty, tudíž je vystaven odlišné mikrobiotě než v přirozeném prostředí, ale především je krmeno jinou potravou než přirozeně v přírodě. Veškerá krmiva jsou připravována tak, aby se co nejvíce podobala potravě ve volné přírodě a splňovala zároveň všechny živinové potřeby zvířete. Někdy ale musí být směs upravena tak, aby bylo možné ji připravit v našich podmínkách. V této bakalářské práci budou popsány bifidobakterie u exotických zvířat chovaných zejména v zoologických zahradách, protože studie zabývající se druhovým zastoupením bifidobakterií u volně žijících zvířat nebyly dosud prováděny.

3.5.1 Kosman bělovousý (*Callithrix jacchus*)

První zástupce z řádu primátů (Primates) kosman bělovousý pochází z Jižní Ameriky, konkrétně z Brazílie. Jedná se o malou drápkatou opici, která má velmi vyvinuté slepé střevo pro trávení složených sacharidů. Je to všežravec, živí se plody, bobulemi, semeny a mízou stromů, popřípadě hmyzem. V lidské péči jsou krmeni rýžovou kaší, arabskou gumou, ovocem a zeleninou (Puschmann et al., 2013).

Osídlení trávicího traktu u primátů je hostitelsky specifické. Bylo analyzováno 6 vzorků čerstvých výkalů mláďete kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*), pocházejících z Verony, severní Itálie. Ve vzorcích výkalů kosmana byl nalezen druh *Bifidobacterium aesculapii* (obr. 3). Jedná se o grampozitivní, nepohyblivou, nesporulující bakterii. Svůj název *B. aesculapii* dostala podle svého stočeného tvaru podobnému hadovi. Může mít také oba konce formované do tvaru písmene Y. Roste za anaerobních i mikroaerofilních podmínek. Kolonie jsou bílé, jemné, neprůhledné, kruhové s rovnými okraji. Mohou růst v rozpětí teplot 25-42 °C, optimální pH je 6,5-7,0 (Modesto et al., 2014).



Obr. 3: Morfologie buněk *B. aesculapii* (Modesto et al., 2014).

Dále byly objeveny další dva druhy bifidobakterií u kosmana bělovousého, tentokrát u zástupce žijícího ve zvířecím domě v Cape Town v Jižní Africe. Jedná se o *Bifidobacterium reuteri* a *Bifidobacterium callitrichos*. *B. reuteri* obvykle měří 0,3-1,0 × 1,5-6 μm, vyskytuje se jednotlivě nebo v párech a má béžové zbarvení. Optimální teplota pro růst je 37 °C a pH 5,0-7,0. Fylogeneticky je příbuzná s *B. boum*. Druhým objeveným zástupcem rodu *Bifidobacterium* je *B. callitrichos*. Měří 0,6-1,2 × 3-8 μm. Buňky se vyskytují jednotlivě, v

párech nebo řetězcích bílé barvy. Optimální teplota pro růst je 30-42 °C a pH 5,0-8,0. Je zde fylogenetická příbuznost s *B. longum* (Endo et al., 2012).

3.5.2 Tamarín žltoruký (*Saguinus midas*)

Tamarín žltoruký, nebo také tamarín mouřeníněk, pochází z oblastí severního povodí řeky Amazonky od Francouzské Guyany přes Surinam, Guyanu a severní Brazílii, na východě k řece Rio Negro. Stejně jako kosman bělovousý je všežravec, živí se převážně květy, plody, bobulemi, semeny, občas i živočišnou potravou, především hmyzem a pavouky. Stromová míza pro ně není příliš důležitá jako u předchozího druhu. Drápkaté opičky potřebují potravu bohatou na energii a zároveň potřebují mnohem více bílkovin než ostatní primáti. V lidské péči jsou krmeni zralými sladkými plody, nenadýmavými druhy zeleniny, dostatkem živočišných bílkovin ve formě hmyzu (mouční červi, cvrčci), tvaroh, vařenými vejci, jemným drůbežím masem, popřípadě sušeným ovocem (hrozinky, datle, fíky) nebo speciálními granulami pro drápkaté opice (Puschmann et al., 2013).

U jednoho ze zástupců tamarína žltorukého chovaného ve zvířecím domě v Cape Town v Jižní Africe byly popsány v roce 2009 tři bifidobakteriální druhy. Prvním z nich je *Bifidobacterium saguini*, která je příbuzná bakterii druhu *B. longum*. Buňky jsou nepohyblivé, většinou se vyskytují jednotlivě, v párech nebo řetězcích, které se mohou větvit. Obvykle měří 0,4-1,0 × 2-6 μm, rostou při teplotě 37-42 °C při pH 5,0-7,0 (Endo et al., 2012).

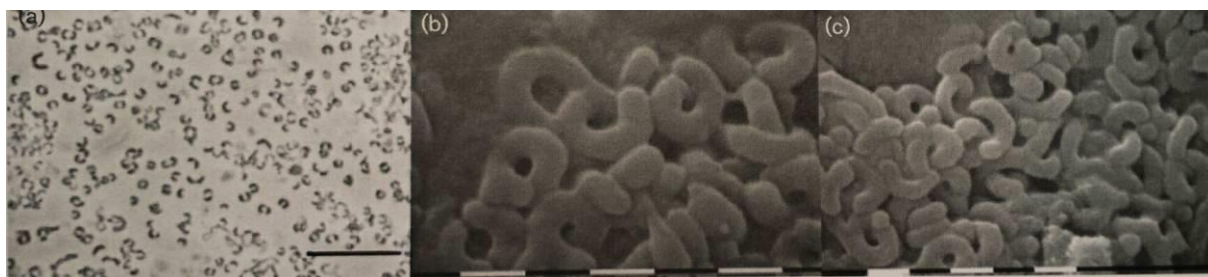
Dalším objeveným druhem je *B. stellenboschense*. Fylogeneticky patří do skupiny s *B. scardovii*. Buňky jsou nepohyblivé, většinou se také vyskytují jednotlivě, v párech nebo v řetězcích, kolonie mají bílou barvu. Jednotlivé buňky měří 0,5-1,0 × 4-10 μm, rostou při 26-42 °C a optimální pH je v rozmezí 5,0-8,0 (Endo et al., 2012).

Posledním objeveným zástupcem u tamarína žltorukého je *B. biavatti*. Fylogeneticky patří do skupiny s *B. bifidum*. Stejně jako předchozí druhy se vyskytuje buď jednotlivě, v párech či v řetězcích. Jednotlivé buňky měří 0,5-1,0 × 3-8 μm, optimální teplota pro růst je 30-42 °C a pH 5,0-7,0. Narostlé kolonie mají bílou barvu a jsou jemné konzistence (Endo et al., 2012).

3.5.3 Lemur kata (*Lemur catta*)

Lemuři patří jako endemité Madagaskaru do podřádu poloopic (Strepsirrhini). Patří mezi sezónní spásáče, což se projevuje v periodické změně stravování. Lemuři mohou být charakterizováni jako příležitostní všežravci s širokou škálou přijímané potravy, což zahrnuje ovoce, listy, stonky listů, květiny, pavouky, pavoučí sítě, housenky, cikády, larvy hmyzu a někdy i menší ptáky. Potravní specializace lemurů vždy souvisí s výraznými odlišnostmi v morfologii GIT. Lemur kata se adaptoval především na rostlinnou potravu, a proto má prodloužené slepé střevo. Slepé střevo je sídlem symbiotických bakterií a předpokládá se, že zde dochází k rozpadu rostlinné buněčné stěny a následné fermentaci listů, stejně jako u ostatních nepřezhýkavých býložravců (Modesto et al., 2015). V lidské péči jsou krmeni zeleninou, ovocem (v přiměřeném množství, nebezpečí tloustnutí), tvářem a hmyzem (Puschmann et al., 2013).

V severní Itálii byl objeven nový druh bifidobakterií, který byl izolován z exkrementů dospělých lemurů kata (*Lemur catta*), kteří žijí v polopřírodních podmínkách v parku Natura Viva (Modesto et al., 2015). Ze vzorků výkalů byly pozorovány buňky bakterií s morfologií připomínající malé stočené hady, podobné jako u *Bifidobacterium aesculapii*, ale menší. Jedná se o nový druh *Bifidobacterium lemurum* (obr. 4). Tato bakterie je vždy svinutého, prstencovitého tvaru nebo má konce do tvaru písmene „Y“. Je to grampozitivní, nepohyblivá, asporogenní bakterie. Roste za anaerobních i mikroaerofilních podmínek. Vytváří kolonie neprůhledné bílé barvy. Optimální teplota pro růst je 37-42 °C (Modesto et al., 2015).

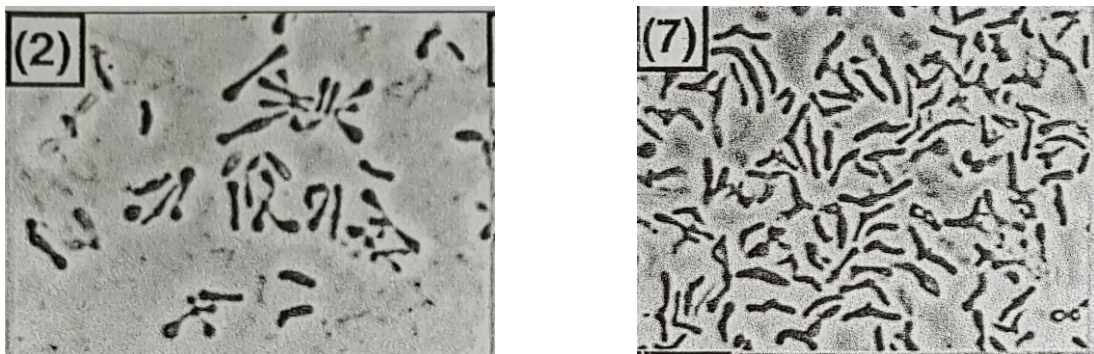


Obr. 4: Morfologie buněk *B. lemurum* (Modesto et al., 2015).

3.5.4 Slon indický (*Elephas maximus*)

Slon je největší žijící býložravec. Patří do řádu chobotnatců (Proboscidea). Anatomie a fyziologie trávicího traktu slona je podobná jako u koně, který má jednoduchý žaludek a objemné tenké a tlusté střevo. Obývá Cejlon, Indii, Sumatru a Borneo. Sloni jsou typičtí býložravci, živí se velkým množstvím travin, kořeny rostlin, kůrou stromů, cukrovou třtinou nebo banány. V lidské péči jsou sloni krmeni senem, slámou, větvemi, zeleninou, ovocem, chlebem, mačkaným ovsem nebo granulovanou směsí pro býložravce (Puschmann et al., 2013).

Byly analyzovány 2 vzorky od dvou slonů ze Zoo Ostrava. Bifidobakterie byly stanoveny kultivačně na selektivním médiu a byly nalezeny v počtu $7,6 \pm 0,56 \log \text{CFU/g}$. A byly pomocí sekvenace DNA a biochemických testů identifikovány jako dva druhy, jednalo se o *Bifidobacterium adolescentis* a *B. boum* (obr. 5). Tyto dvě bifidobakterie se nejčastěji vyskytují v GIT býložravců. *B.boum* byl poprvé izolován Scardovi et al. (1979) z bachoru skotu a výkalů prasat. *B. adolescentis* byla nalezena ve více ekologických nikách např. bachor skotu, lidská vagina nebo odpadní vody (Bunešová et al., 2013). Ale jak již bylo zmíněno, zvíře držené v zajetí má pravděpodobně jiné osídlení mikrobity než slon volně žijící v Indii, proto nelze tvrdit, že tyto dva nalezené bifidobakteriální druhy jsou typické pro slona indického.



Obr. 5: Morfologie buněk *B. adolescentis* (2) a *B. boum* (7) (Biavati and Mattarelli, 2012).

3.5.5 Panda velká (*Ailuropoda melanoleuca*)

Přestože je panda velká zástupce řádu šelem (Carnivora), tak je to býložravec a živí se výhradně rostlinnou stravou, konkrétně bambusem, bylinami či travinami. Pouze příležitostně se živí ptačími vejci nebo ptáky, kořist neloví cíleně, pouze ji náhodně požírají (Puschmann et al., 2013). Je dobře známo, že býložravci mají poměrně dlouhý trávicí trakt, který osidlují populace mikroorganismů, kteří jsou schopni využít a zpracovat vlákninu obsaženou v rostlinné potravě. Avšak trávicí trakt pandy se skládá z jednoduchého žaludku, nemá slepé střevo a má krátké a jednoduché střevo, které je anatomicky podobné jako u šelem. Toto výjimečné anatomické složení GIT a nízká stravitelnost potravy značí, že mikroorganismy hrají podstatnou roli v trávení pandy velké (Hirayama et al., 1989).

V zoologických zahradách je krmení pand trochu odlišné od krmení ve volné přírodě. Pandám se 2krát až 3krát denně podává kašovitá speciální krmná směs různých receptur (např. vařená rýže, granule pro primáty, mleté maso, vejce, med). Kromě těchto kaší se podávají také jablka, hrušky, mrkev a 2krát až 3krát denně bambusy různých rodů (Puschmann et al., 2013).

Neexistuje mnoho studií o bakteriálním složení mikroflóry pandy velké. Ale v jedné studii byly zkoumány výkaly dvou dospělých jedinců a jednoho mláděte ze zoologické zahrady v Tokyu, v Japonsku. V mikrobiotě dospělých jedinců převažovaly bakterie *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Enterobacteriaceae*. Bakterií rodu *Bacteroidaceae* a *Bifidobacterium* byl nízký počet ($<10^5$ CFU/g). Naopak u mláděte převládaly anaerobní bakterie, převažoval rod *Bifidobacterium* a *Clostridium*. Po přechodu na rostlinnou stravu (bambusové listí) poklesl počet laktobacilů a bifidobakterií, které už poté nebyly detekovatelné (Hirayama et al., 1989).

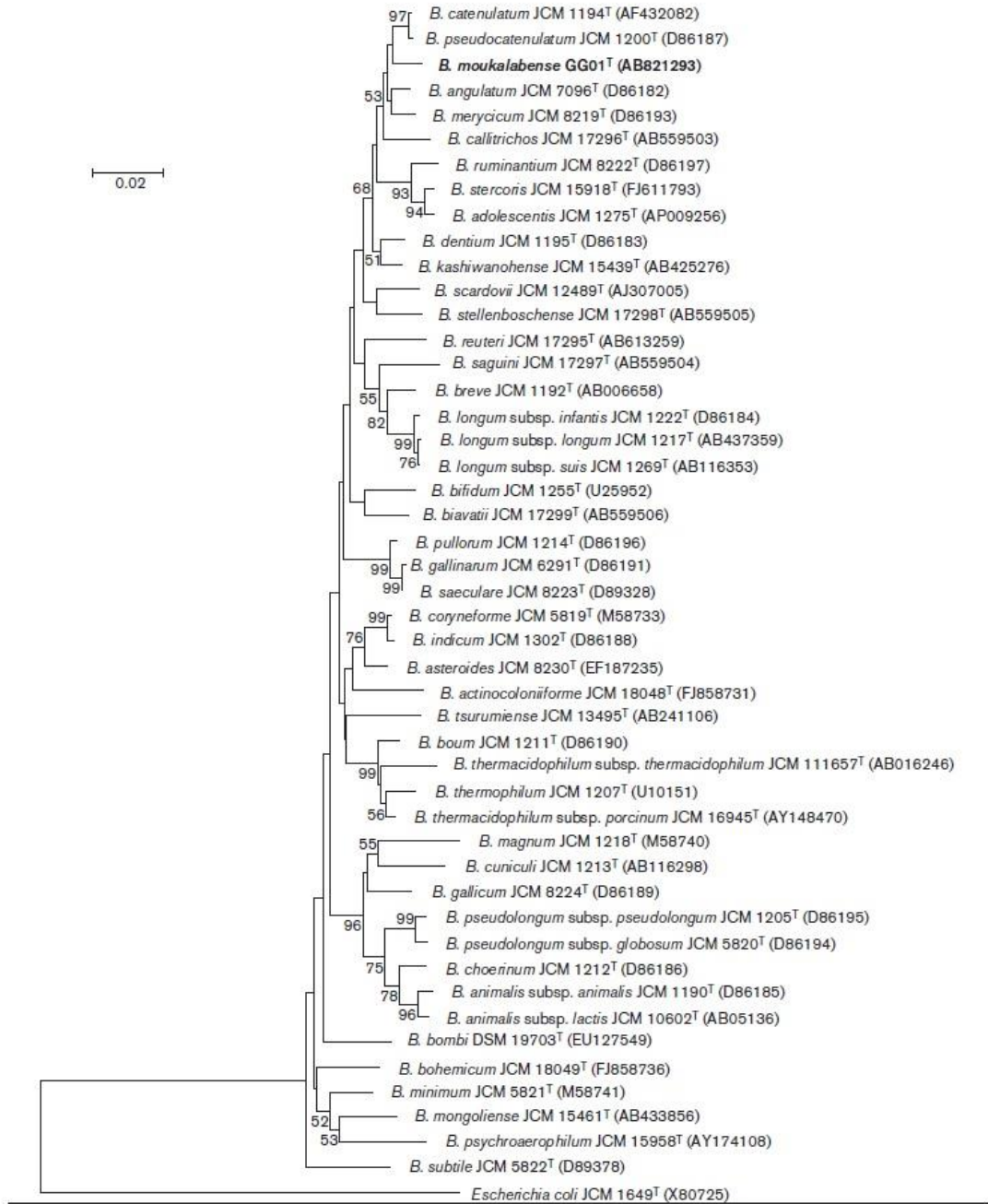
3.5.6 Gorila nížinná (*Gorilla gorilla gorilla*)

Gorilla gorilla gorilla je poddruh gorily západní (*Gorilla gorilla*). Gorily patří mezi největší lidoopy. Projevuje se u nich výrazný pohlavní dimorfismus. Její přirozené místo výskytu jsou vlhké deštné lesy v jihovýchodní Nigérii, Kamerunu, Středoafričské republice,

Demokratické republice Kongo a Gabonu. Patří mezi ohrožené druhy vyhobením. Většinou žijí v harémovém seskupení, kdy je 1 dospělý samec a 1 nebo více dospělých samic s jejich potomky. Ve skupině je jasně stanovená hierarchie. Živí se výlučně rostlinnou potravou, především bylinami, dřeví z výhonků, listím stromů nebo volně rostoucími plody. V lidské péči je potrava podobná jako ve volné přírodě, hodně větví, zeleného krmení, zelenina, ovoce, popřípadě vyráběné granulované směsi pro gorily (Puschmann et al., 2013).

Vzorky byly odebrány od volně žijících goril nížinných v Gabonu, žijící v národním parku Moukala-Doudou (MDNP). Čerstvé vzorky výkalů byly odebrány od skupiny goril skládající se ze stříbrného samce, 7 samic, 11 mladých nedospělých jedinců a 4 mláďat. Předpokládalo se, že střevní mikrobiota lidoopů bude obsahovat bifidobakterie, jelikož se jedná spolu se šimpanzy o blízké příbuzné člověka. U goril byl popsán nový druh bifidobakterií, a to druh *Bifidobacterium moukalabense*. *B. moukalabense* má tvar tyčinek různé délky, především v rozmezí 2-4 μm . Je často rozvětvená se zakulacenými konci. Kolonie mají neprůhlednou hnědočervenou barvu. Optimální teplota pro růst je 37 °C (Tsuchida et al., 2014). Z hlediska fylogeneze je *B. moukalabense* příbuzná druhu *B. pseudocatenulatum* a *B. catenulatum* (obr. 6).

Další studie tvrdí, že *B. moukalabense* je velice podobná jak fylogenetickou strukturou, tak strukturou genomu *B. dentium* (Lugli et al., 2014), která se obvykle nachází v lidském zubním kazu (Biavati and Mattarelli, 2012).



Obr. 6: Fylogenetický strom rodu *Bifidobacterium* se zaměřením na *B. moukalabense* (Tsuchida et al., 2014).

4 Metodika

V rámci praktické části bakalářské práce bylo analyzováno několik vzorků výkalů od různých druhů zvířat žijících v Zoologické zahradě Praha. Byl kladen důraz především na získání nových izolátů probiotických bakterií, proto byly stanoveny počty bifidobakterií a laktobacilů a bakterie byly identifikovány. Dále byly stanoveny celkové počty anaerobních bakterií, aby bylo možné zjistit procentické zastoupení probiotických bakterií v mikrobiotě trávicího traktu.

4.1 Mikrobiologický rozbor vzorků výkalů

4.1.1 Popis zvířat a jejich výživy

Byly získány vzorky výkalů od 4 zvířat ze Zoo Praha, každý z nich byl označen číslem (1- fretka domácí, 2- nosál červený, 3- morče domácí, 4- liška polární).

První vzorek byl odebrán od pětileté samice fretky domácí (*Mustela putorius furo*). Patří do řádu šelem (Carnivora) z čeledi lasicovití (Mustelidae). Fretka byla domestikována z tchoře tmavého. Ve volném překladu její latinský název znamená „páchnoucí zloděj zabíjející myši“. Je to jediná domestikovaná kunovitá šelma. Fretka je masožravec, který se ve volné přírodě žije převážně ulovenými malými obratlovci (rybami, obojživelníky, plazy, ptáky a menšími savci až do velikosti slepice) (Ullrich, 2000). V zoologické zahradě jsou krmeny vařeným mletým nebo kuřecím masem, popř. rybami.

Druhý vzorek byl odebrán od tříleté samice nosála červeného (*Nasua nasua*) z řádu šelem (Carnivora), čeledi medvídkovití (Procyonidae). Jejich přirozené místo výskytu je Jižní Amerika, kde je aktivní ve dne a žije společensky ve skupinách. Jsou to všežravci, podíl rostlinné potravy činí asi 25 %. Ve volné přírodě se živí plazy, drobnými hlodavci, vejci, červy, plži, rybami, obojživelníky, ovocem, semeny a výhonky (Puschmann et al., 2013). V zoologické zahradě se jejich krmení musí trochu uzpůsobit místním podmínkám. Jsou krmeni především směsí ze syrového hovězího masa, vařeného kuřecího masa, ovocem (hroznové víno, banán, hruška), s přidávkem vařené zeleniny. Může se také přimíchat tvrdý tvaroh či

syrové vejce. Pro zpestření se jednou za čas podává celé vejce na tvrdo či usmrcená malá myš.

Dalším jedincem od kterého byl získán vzorek trusu je morče domácí (*Cavia aperea f. porcellus*) staré cca 2 roky. Patří do řádu hlodavci (Rodentia), čeleď morčatovití (Caviidae). Jedná se o zdomestikovanou formu morčete divokého (*Cavia aperea*). Původně obýval Jižní Ameriku s výjimkou Brazílie, Jižní Argentiny a Chile. Jsou to denní živočichové, kteří žijí společensky v malých skupinách. Ve volné přírodě se živí travinami, bylinami, listy a kůrou stromů (Puschmann et al., 2013). V lidské péči jsou krmeni senem, zeleninou, ovocem, směsí pro hlodavce a suchým pečivem pro obrušování hlodavých zubů.

Poslední vzorek byl získán od pětileté samice lišky polární (*Vulpes lagopus*). Patří do řádu šelem (Carnivora), čeleď psovití (Canidae). Místem přirozeného výskytu je Severní Amerika, kde obývá tundry a arktické ostrovy pokryté ledovcem. Je aktivní ve dne a za soumraku, žije společenským způsobem života. Živí se červy, rybami, žábami, ještěrkami, vejci, ptáky a menšími savci. Hlavní potravou lišky polární jsou lumíci (Puschmann et al., 2013). V zoologické zahradě jsou krmeny především syrovým hovézím masem, holátkou, popř. kočičími konzervami a rybami.

4.1.2 Odběr vzorků a mikrobiologický rozbor

Při sběru výkalů byl vždy odebrán 1 g výkalu do 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu, čímž bylo vytvořeno ředění 10^{-1} . Následně byl vzorek sériově naředěn ve vialkách s 9 ml stejného média do konečného poměru $1:10^8$ g/ml. Ředění bylo prováděno asepticky stříkačkou a jehlou, kdy byl odebrán 1 ml suspenze a ten byl převeden do další vialky, čímž vzniklo ředění 10^{-2} . Takto se postupovalo dále až do vytvoření ředění 10^{-8} . Na přípravu každého ředění byla použita nová stříkačka a jehla. Příslušné naředěné vzorky byly umístěny na Petriho misky ve dvou opakováních, které byly okamžitě zality selektivními půdami. Pro stanovení bifidobakterií byl použit modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přidavkem sójového peptonu (5g/l), cysteinu (0,5 g/l), tweenu 80 (1 ml/l), mupirocinu (100 mg/l) a ledová kyselina octová (1ml/l). Půda svým složením podporuje růst bifidobakterií, mupirocin potlačuje rozvoj příbuzných bakterií mléčného kvašení a kyselina octová eliminuje růst bakterií citlivých na nízké pH. Kultivace probíhala v anaerobním prostředí při 37 °C po dobu 48-72 hodin.

Anaerobní atmosféra je nezbytná pro růst bifidobakterií a zároveň se uplatňuje jako selektivní faktor pro potlačení aerobních bakterií.

Pro stanovení počtu laktobacilů byl použit Rogosa agar, kde selektivně působí v médiu pH, jehož hodnota je upravena na 5,4 kyselinou octovou. Tímto způsobem je podpořen růst laktobacilů, zatímco ostatní bakterie mléčného kvašení jsou potlačeny. Kultivace probíhala 72 hodin při 37 °C v mikroaerofilním prostředí, které bylo zajištěno dvojí vrstvou agaru.

Pro stanovení celkových počtů anaerobních bakterií byl použit Wilkins-Chalgren bujón, stejného složení jako u stanovení bifidobakterií, bez přidání ledové kyseliny octové a mupirocinu. Kultivace probíhala v anaerobním prostředí při 37 °C po dobu 48-72 hodin.

Po kultivaci byly spočítány kolonie, které byly označeny lihovým fixem. Konečné množství bakterií bylo vypočteno podle následujícího vztahu a výsledky jsou vyjádřeny jako počet kolonie tvořících jednotek v 1 g vzorku (KTJ/g).

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

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

F - převrácená hodnota vyššího ředění

KTJ - kolonie tvořící jednotka

4.2 Identifikace bakterií

Po kultivaci byly izolovány čisté kmeny bifidobakterií a laktobacilů, které byly následně podrobeny mikrobiologické kontrole, kde byla sledována čistota izolátů a morfologie buněk. Jak již bylo dříve zmíněno, bifidobakterie jsou nepravidelné tyčinky s proměnlivou délkou, mohou být různě ohnuté až větvené. Buňky mohou mít tvar písmene V nebo Y. Bakterie se mohou různě shlukovat, může se vyskytnout i hvězdicovité uspořádání. Častěji se ale vyskytují jednotlivě nebo v řetězcích (Biavati and Mattarelli, 2012). Laktobacily jsou pravidelné, nesporulující a nepohyblivé tyčinky, mohou se ale také vyskytovat ve formě kokobacilů, které existují samostatně nebo jsou uspořádány v řetězcích (Claesson et al., 2007).

4.2.1 Rodová identifikace bifidobakterií

Následně byla provedena rodová identifikace bifidobakterií pomocí detekce aktivity enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy. Jedná se o enzym specifický pro čeleď Bifidobacteriaceae. Bakterie této čeledi mohou být spolehlivě odlišeny od dalších bakterií na základě odlišného metabolismu sacharidů. Bifidobakterie spolu s dalšími bakteriemi z čeledi Bifidobacteriaceae štěpí hexosy pomocí enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa (F6PPK), jehož detekce je využívána jako metoda rodové identifikace bifidobakterií. Pro detekci F6PPK je nejprve nutné rozbít bakteriální buňky, aby se tento intracelulární enzym vylil do roztoku. K rozrušení buněk lze použít detergent cetridium bromid a následně jsou k roztoku přidána činidla, která způsobí barevnou reakci. Při pozitivní reakci dojde k vytvoření fialového zbarvení a izolát může být označen jako *Bifidobacterium* sp. Důvod vzniku fialového zbarvení je takový, že fruktoso-6-fosfát je enzymem rozštěpen na erytroso-4-fosfát a acetyl-1-fosfát., který reaguje s FeCl_3 za vzniku komplexní sloučeniny, která má právě fialové zbarvení. Naopak při negativní reakci má roztok žlutou barvu, kdy nedochází k rozštěpení fosfátu (Biavati and Mattarelli, 2012).

Postup při provedení F6PPK testu (detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy)

Z předchozí práce bylo získáno 5 izolátů, o kterých se dle morfologie dalo předpokládat, že se jedná o rod *Bifidobacterium*. U těchto kmenů byl proveden F6PPK test, jeden kmen byl použit jako negativní kontrola.

Přes noc narostlé kultury bakterií byly přelity do centrifugačních zkumavek. Všechny 6 zkumavek se suspenzí bakterií bylo vloženo do centrifugy na 5 minut na 12 000 otáček k oddělení narostlé kultury od kultivačního média. Následně byl odlit pelet, ve zkumavce tak zůstala pouze narostlá kultura. Jako první se přilil do zkumavky fosfátový pufr (0,12 g K_2HOP_4 ; 0,33 g KH_2PO_4 ; 0,05 g cystein; 100 ml vody). Následně byla promíchána narostlá kultura s fosfátovým pufrem. Jako další byl přidán cetridium bromid (CTAB) v množství 0,2 ml o koncentraci 45mg/100 ml H_2O . Takto vzniklá směs se nechala 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Přidání CTAB způsobí rozpad buněk a vylití intracelulárních enzymů do prostředí. Následně byl aplikován roztok NaF (0,6g/100 ml H_2O , Na- iodoacetát 1g/ 100 ml

H₂O) v množství 0,2 ml a 0,2 ml fruktoso-6-fosfátu, substrát pro působení enzymu (1 dávka = 6,6 mg/0,2 ml H₂O). Takto vzniklá směs byla vložena do vodní lázně o teplotě 37 °C na 30 minut. Po 30 minutách byly zkumavky vyjmuty z vodní lázně, bylo přidáno 0,75 ml roztoku hydroxylaminu (13,9 g/100 ml). Po 10 minutách při pokojové teplotě byly dodány tři poslední roztoky, 15% roztok TCA, 4 M HCl a roztok FeCl₃ (5g/100 ml H₂O; + 310 µl HCl), v množství 0,5 ml od každého roztoku. Přidání posledního roztoku, FeCl₃, se obsah zkumavky zbarvil do fialova nebo do žluta. Fialová barva značí pozitivní reakci a izolát může být označen jako *Bifidobacterium* sp. Naopak žluté zbarvení značí negativní reakci.

5 Výsledky

5.1 Počty bakterií ve vzorcích výkalů zvířat

V následující tabulce jsou znázorněny stanovené počty bifidobakterií, laktobacilů a celkových počtů anaerobních bakterií ve vzorcích výkalů zvířat, které byly vypočítány podle již dříve v textu zmíněného vztahu. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet kolonie tvořících jednotek v 1 g vzorku (KTJ/g).

Tab. 1: Počty mikroorganismů obsažených ve vzorcích 1-4 (1- fretka domácí, 2- nosál červený, 3- morče domácí, 4- liška polární)

Vzorek	CP (log KTJ/g)	Bifidobakterie		Laktobacily	
		počet (log KTJ/g)	% z CP	počet (log KTJ/g)	% z CP
1	9,80	9,07*	59,05	8,08	6,00
2	9,33	8,07	5,47	7,16	0,68
3	8,24	7,43	15,54	6,24	1,00
4	8,26	7,45*	15,48	3,46	0,00

CP= celkové počty

* Jedná se pravděpodobně o počty klostridií, podle rodové identifikace izolátů nebyly bifidobakterie ve vzorku přítomny.

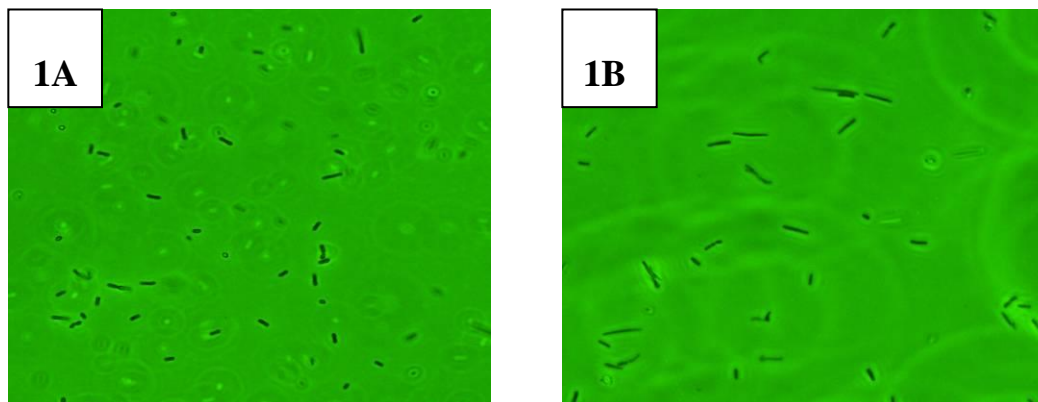
Celkové počty anaerobních bakterií se pohybovaly od 8,24 do 9,80 log KTJ/g. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorku fretky domácí, nejnižší naopak u morčete domácího. Počty bifidobakterií se pohybovaly v rozmezí hodnot od 7,43 do 9,07 log KTJ/g. Nejvyšší počet bifidobakterií byl zaznamenán u fretky domácí, kde je ale hodnota nepřesná, jelikož se pravděpodobně jednalo o počty klostridií. Tudíž nejvyšší počet bifidobakterií byl zaznamenán u nosála červeného. Naopak nejnižší hodnota byla zaznamenána u morčete domácího. U nosála červeného zastoupení bifidobakterií činí 5,47 % z celkového počtu stanovených bakterií a u morčete domácího jsou bifidobakterie zastoupeny 15,54 % z celkového počtu anaerobů. Počty laktobacilů se pohybovaly od 3,46 do 8,08 log KTJ/g. Nejnižší hodnota byla zaznamenána u lišky polární, kde se žádné laktobacily nenacházely a jejich procentuální hodnota z celkových počtů anaerobů se tedy rovnala nule. Naopak nejvyšší hodnota byla zjištěna u fretky domácí, kde se procentuální vyjádření z hodnoty celkových počtů dostalo na hodnotu 6 %.

5.2 Identifikace izolovaných bifidobakterií a laktobacilů

Bylo získáno celkem 9 kmenů bakterií z Rogosa agaru, o kterých je možné předpokládat, že se jedná o laktobacily. Rodová příslušnost a čistota byla prověřena mikroskopicky. Z modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru bylo získáno 8 izolátů. Stejně jako u laktobacilů byla rodová příslušnost a čistota prověřena mikroskopicky. Konkrétně byly izolovány z výkalů fretky domácí 3 kmeny laktobacilů, od nosála červeného byly izolovány 3 kmeny laktobacilů a 2 kmeny bifidobakterií. Ze vzorku výkalu získaného od morčete domácího byly izolovány 2 kmeny laktobacilů a 1 kmen bifidobakterií a z výkalů lišky polární byl izolován 1 kmen laktobacilů a 2 kmeny bifidobakterií.

Izoláty získané z modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru ze vzorku číslo 1 od fretky domácí byly po mikroskopické kontrole vyřazeny, protože morfologicky neodpovídaly bifidobakteriím, jednalo se o pravidelné tyčinky. Navíc u nich byla zaznamenána produkce plynu, což je charakteristické pro rod *Clostridium*. Ze vzorků fretky byly z probiotických bakterií izolovány pouze laktobacily. Na následujícím obrázku (obr. 7) jsou zachyceny dva z nich (1A, 1B: 1- izolát ze vzorku číslo jedna; A,B- označení izolátu). Bifidobakterie v tomto vzorku nebyly objeveny.

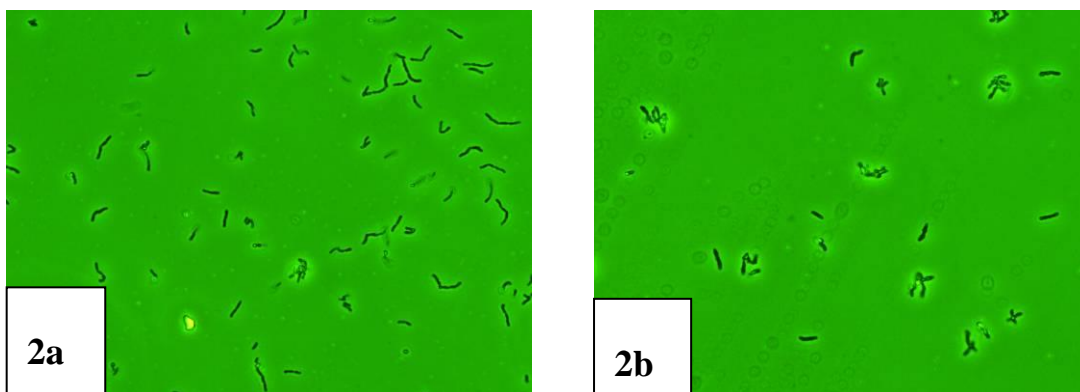
Obr. 7: Laktobacily ze vzorku č. 1 (fretka domácí, izolovány dva kmeny 1A a 1B)



Ze vzorku číslo 2, získaného od nosála červeného (*Nasua nasua*) bylo izolováno celkem 5 kmenů bakterií. Jak je možné vidět na následujících obrázcích (obr. 8), které byly získány ze dvou izolátů (2a,b: 2- izolát ze vzorku číslo dva; a,b- označení izolátu). Podle

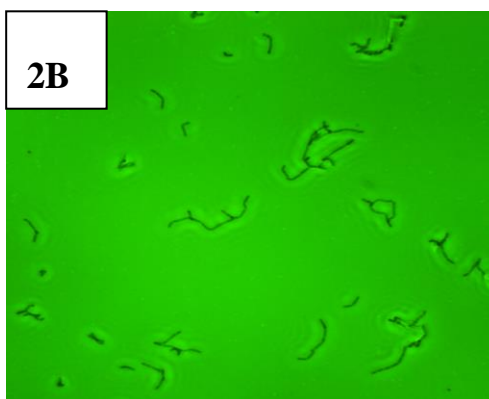
morfologie se jedná o rod *Bifidobacterium*. Jsou zde vidět nepravidelné tyčinky, některé jsou ve tvaru písmene Y.

Obr. 8: Bifidobakterie ze vzorku č. 2 (nosál červený, izolovány dva kmeny 2a a 2b)



Ze vzorku č. 2 byly izolovány také bakterie rodu *Lactobacillus* (obr. 9). Ze tří izolátů byl získán pouze jeden snímek, protože všechny izolované bakterie vykazovaly stejnou morfolonii (2B: 2- izolát ze vzorku číslo dva, B- označení izolátu). Jedná se o pravidelné nesporulující tyčinky, které se vyskytují jednotlivě nebo v řetězcích.

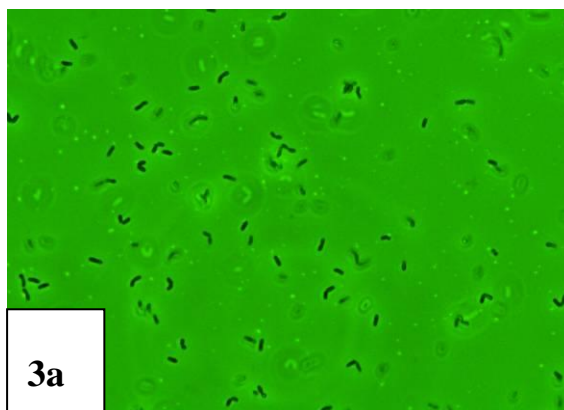
Obr. 9: Laktobacily ze vzorku č. 2 (nosál červený, izolován jeden kmen 2B)



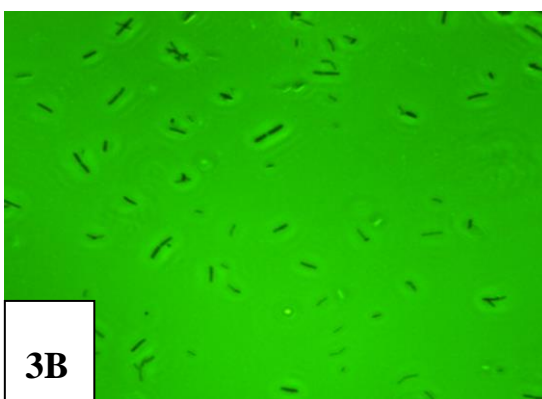
Další snímek byl pořízen z mikroskopického pozorování izolátu ze vzorku číslo 3, pocházejícího od morčete domácího (*Cavia aperea f. porcellus*). I zde je možné pozorovat

nepřavidelné tyčinky různé velikosti s typickou morfológií rodu *Bifidobacterium* (obr. 10). Byl získán pouze jeden izolát (3a: 3- izolát získaný ze vzorku číslo tři; a- označení izolátu). Stejně tak byly u vzorku číslo 3 nalezeny bakterie rodu *Lactobacillus* (obr. 11). V rámci rodu *Lactobacillus* byly získány 2 izoláty, zařazena je pouze jedna fotografie, protože oba kmeny vykazovaly stejnou morfológií (3B: 3- izolát získaný ze vzorku číslo tři; B- označení izolátu).

Obr. 10: Bifidobakterie ze vzorku č. 3 (morče domácí- izolován jeden kmen 3a)



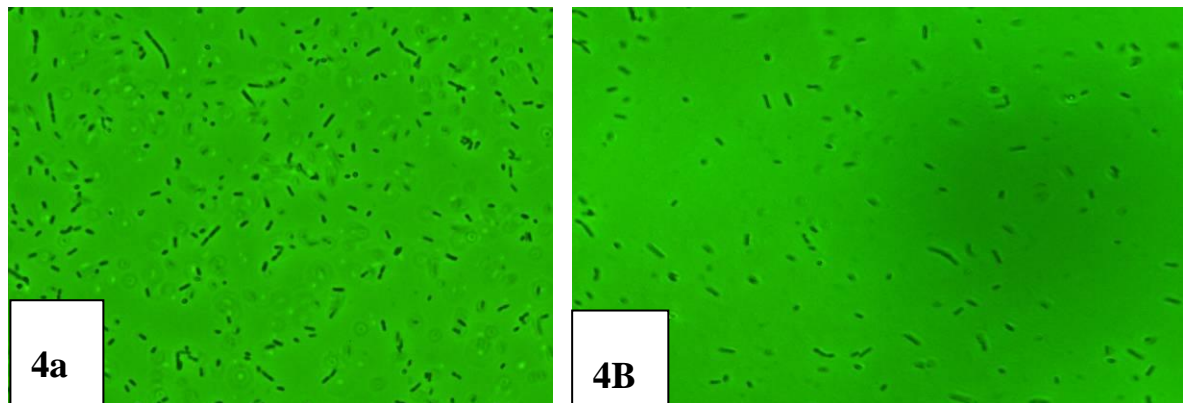
Obr. 11: Laktobacily ze vzorku č. 3 (morče domácí- izolován jeden kmen 3B)



Z posledního vzorku získaného z výkalů lišky polární byly získány 2 izoláty na detekci bifidobakterií, ale oba vypadaly stejně, proto je zde uveden pouze jeden snímek 4a (obr. 12). Na snímku je vidět, že bakteriální izolát 4a není čistý. Kmen izolovaný z

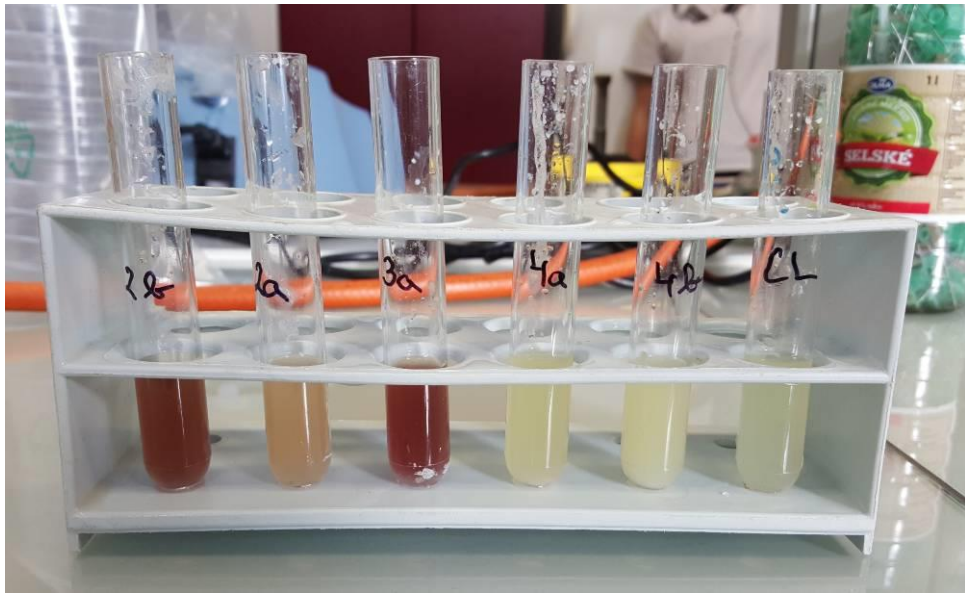
modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru nevykazoval typickou morfológiu bifidobakterií (obr. 12: 4a), dle morfológie se jedná o laktobacily (obr. 12: 4B).

Obr. 12: Osídlení trávicího traktu lišky polární (získané izoláty 4a, 4B)



Pro rodovou identifikaci 5 izolátů z modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru, o kterých bylo možné se domnívat, že se jedná o bifidobakterie byl proveden test na aktivitu enzymu F6PPK. Výsledky testu je možné vidět na obrázku 13. Izoláty 2b, 2a, které pochází ze vzorků výkalů nosáka červeného a izolát 3a, pocházející ze vzorku výkalů morčete domácího, byly pozitivní, prokázala se tedy aktivita enzymu F6PPK a jedná se o bifidobakterie. U dvou ostatních izolátů (4a a 4b) se aktivita enzymu neprokázala, tudíž se nejedná o bifidobakterie. Přítomnost bifidobakterií se prokázala u nosáka červeného a morčete domácího, bifidobakterie nebyly nalezeny u fretky domácí a lišky polární.

Obr. 13: Výsledky F6PPK testu



2a, 2b, 3a- pozitivní výsledek na detekci rodu *Bifidobacterium* (izoláty 2a, 2b- získané z výkalů nosála červeného 3a- izolát získaný z výkalů morčete domácího)

4a, 4b- negativní výsledek na detekci rodu *Bifidobacterium* (izoláty 4a, 4b ze vzorků výkalů lišky polární)

CL- negativní kontrola (CL- rod *Clostridium*)

6 Diskuze

Trávicí trakt zvířat je osídlen celou řadou mikroorganismů. Skladba mikrobioty vykazuje značné odlišnosti napříč živočišnými druhy, a také v různých oddílech trávicího traktu (Bunešová et al., 2014). Složení mikrobioty gastrointestinálního traktu má zásadní vliv na zdraví hostitele. Mikroorganismy napomáhají trávení zkonsumované potravy, stimulaci rozvoje střevního hlenu, udržení střevní integrity a hlavně také podporují vývoj a průběžnou stimulaci imunity (Geigerová et al., 2014). Dle Hoopera a Macphersona (2010) je rozhodující období pro ovlivnění mikrobioty jedince období po narození.

Bifidobakterie patří do skupiny probiotických bakterií, které jsou přirozenými obyvateli gastrointestinálního traktu savců, nacházejí se ale také v lidské vagíně, odpadních vodách či potravinách jako jsou sýry nebo maso (Bunešová et al., 2014). Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos. Jejich největší koncentrace je v tlustém střevě savců v období mléčné výživy. Probiotické bakterie poskytují hostiteli zdravotní přínos, neboť udržují zdraví trávicího traktu, stimulují imunitní systém a zajišťují odolnost vůči mikrobiálním infekcím (Biavati and Mattarelli, 2012). Kolonizace pozitivně působících bakterií je však omezena, pokud jsou mláďata ihned po porodu odebrána matce. Následkem toho může nastat riziko průjemových onemocnění z důvodu nerovnováhy ve složení gastrointestinální mikrobioty mláďete. Mezi další pozitivně působící mikroorganismy trávicího traktu patří také laktobacily. V průběhu života se skladba mikrobioty mění (Geigerová et al., 2014).

Vyšší koncentrace bifidobakterií u mláďat na mléčné výživě byla prokázána například ve studii Vlkové et al. (2008), která porovnávala osídlení trávicího traktu bifidobakteriemi u dvou skupin telat. Obě skupiny mláďat byly po porodu ustájeny v individuálních boxech a první 3 dny byly krmeny kolostrem, které zajistilo důležité protilátky pro přežití mláďat. První skupina byla poté krmena kravským mlékem a druhá skupina telat byla kromě mléčné náhrady krmena také starterem a senem. Hodnoty bifidobakterií ve 4. dnu věku byly u obou skupin podobné, 7,7 log CFU/g, ale ve věku 21 dní byly hodnoty zcela odlišné. U mláďat krmených kravským mlékem se počty bifidobakterií pohybovaly okolo hodnoty 9,32 log CFU/g, zatímco u telat na kombinované dietě se hodnota dostala pouze na 7,26 log CFU/g. Z uvedených hodnot je zřejmé, že složení krmené dávky má zásadní vliv na počet bifidobakterií

v trávicím traktu u mláďat. Pro zvýšení životaschopnosti a zdraví mláďete je dobré ponechat mláďe u matky až do odstavu, kdy je trávicí trakt osídlen probiotickými bakteriemi přirozeně. Množství probiotických bakterií v trávicím traktu je možné zvýšit podáváním probiotik jako doplňku stravy ve stresujících obdobích, vhodné je zařazení probiotik po podávání antibiotik a u zvířat držených v zajetí zejména po období odstavu a na začátku laktace (Biavati and Mattarelli, 2012). Pro hospodářská zvířata se podávají nejčastěji bakterie rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* nebo kvasinky rodu *Saccharomyces* (Gaggia et al., 2010).

Bifidobakterie byly doposud prostudovány nejvíce u člověka a hospodářských zvířat, ale jejich přítomnost byla prokázána i u exotických zvířat a hmyzu (Bunešová et al., 2014). Exotické zvíře lze definovat jako zvíře, které je cizokrajné, neobvyklé, nežije v České republice ve volné přírodě. Tato zvířata jsou chována v zoologických zahradách, zooparcích či jiných zájmových chovech.

Podle již dříve zmíněných studií byly bifidobakterie nalezeny jak u býložravých, tak u všežravých jedinců. Z býložravých zástupců lze jmenovat například slona indického. U něj bylo identifikováno *B. adolescentis* a *B. boum* (Bunešová et al., 2013), která se nachází také u bachoru skotu (Biavati and Mattarelli., 2012). U pandy velké byl pozorován vyšší počet bifidobakterií u mláďat, ale u dospělých jedinců se také bifidobakterie objevily (Hirayama et al., 2015). U gorily nížinné byl identifikován zcela nový druh *B. moukalabense*, který nebyl doposud zaznamenán u jiného druhu zvířete (Tsuchida et al., 2014). Bifidobakterie byly nalezeny také u všežravého kosmana bělovousého, který se živí plody, semeny, hmyzem a mízou stromů. Bylo u něj nalezeno *B. aesculapii* (Modesto et al., 2014) a dle Endo et al. (2012) bylo u kosmana bělovousého také objeveno *B. reuteri* a *B. callitrichos*. Další tři druhy bifidobakterií byly nalezeny u všežravého tamarína žlutorukého, který se živí zejména květy, plody, bobulemi, semeny a hmyzem. Jedná se o *B. saguini*, *B. stellenboschense*, *B. biavatti* (Endo et al., 2012). Podobně je tomu u lemura katy, který je také všežravý a dle studie Modesta et al. (2015) se v jeho trávicím traktu nachází *B. aesculapii* a *B. lemurum*.

Výskyt bifidobakterií u hmyzu není zcela typický, a proto byl připojen k exotickým zvířatům do bakalářské práce. U hmyzu byly probiotické bakterie zaznamenány u druhů, žijících především sociálním způsobem života jako například včely, vosy, švábi a čmeláci. U včel bylo identifikováno *Bifidobacterium indicum*, *B. asteroides* a *B. coryneforme* (Kopečný

et al., 2010), u čmeláků byla prokázána přítomnost nového druhu bifidobakterií *B. commune* (Praet et al., 2013). U obratlovců je však škála osídlení trávicího traktu mikroorganismy rozmanitější. Mnoho bifidobakteriálních druhů není hostitelsky specifických a mohou být nalezeny u více druhově rozdílných živočichů (Biavati and Mattarelli., 2012; Bunešová et al., 2014). U savců je bakteriální diverzita určena také prostředím, ve kterém se zvíře nachází a výživou, která je zvířeti poskytnuta. Bakteriální diverzita gastrointestinálního traktu je nejrozmanitější u býložravců, snižuje se přes všežravce až k masožravcům. U býložravců hraje přítomnost komenzálních bakterií důležitou roli v získání energie živin z krmiva, jelikož savčí enzymy neumožňují trávení celulózy a dalších komplexních sacharidů. Složení střevní mikrobioty se liší u jedinců žijících v zajetí oproti jedincům stejného druhu žijících ve volné přírodě. (Geigerová et al., 2014).

Fakt, že výživa ovlivňuje výskyt probiotických bakterií ve střevní mikrobiotě, byl dokázán v praktické části mé bakalářské práce. Vzorky odebrané od všežravého nosála červeného a od býložravého morčete domácího, obsahovaly bifidobakterie. Jejich počet při kultivačním stanovení u nosála červeného dosahoval hodnoty 8,07 log KTJ/g a u morčete domácího 7,43 log KTJ/g. Přítomnost bifidobakterií byla potvrzena nejen při mikroskopickém pozorování, ale také při provedení F6PPK testu. Bifidobakterie se zde nacházely, přestože se nejednalo o mláďata, ale o dospělé jedince. V porovnání s výsledky studie Rady a Petra (2002), kteří odebrali vzorky od různých druhů zvířat chovaných v laboratorních podmínkách v Konárovicích, byly naměřeny podobné počty bifidobakterií. U vzorků výkalů od morčete se počet bifidobakterií pohyboval okolo hodnoty 8,33 log CFU/ml, u křečka 8,54 log CFU/g. V případě porovnávání morčat, morčete domácího ze Zoo Praha a morčete z laboratorních podmínek, byl počet bifidobakterií u morčete ze zoo o něco málo nižší.

V případě vzorku získaného od fretky domácí a lišky polární (oba dva druhy jsou masožravé) nebyla přítomnost bifidobakterií prokázána, u obou zástupců byly zjištěny pouze laktobacily. U fretky domácí v hodnotě 8,08 log KTJ/g a u lišky polární 3,46 log KTJ/g. Většina zástupců z řádu Carnivora konzumuje masitou potravu, proto mají jednoduchý žaludek, nekonzumují tolik vlákniny jako býložravci. Savci z řádu Carnivora mají specifické osídlení mikrobioty trávicího traktu, což je odlišuje od býložravců a všežravců (Ley et al., 2014). Pro masožravé zástupce je typické nízké zastoupení bifidobakterií ve střevní mikrobiotě (Endo et al., 2010).

Studie Hirayama et al. (1989) se zabývala bakteriálním osídlením trávicího traktu u pandy velké. U dospělých jedinců se pohybovaly počty bifidobakterií v rozmezí hodnot 3,5-4,1 log CFU/g, zatímco u mláďat před přechodem na rostlinnou stravu byla zjištěna vyšší hodnota bifidobakterií, 8,4 log CFU/g. Počty laktobacilů u dospělců pandy velké se pohybovaly mezi hodnotami 5,1-6,1 log CFU/g, u mláďat byla opět vyšší hodnota než u rodičů, tedy 9,2 log CFU/g. Uvedené počty z předchozí studie potvrdil Ley et al. (2008), který tvrdí, že navzdory tomu, že panda velká konzumuje býložravou stravu, tak její osídlení trávicího traktu je podobnější spíše zástupcům z řádu šelem (Carnivora). Přestože panda velká není typickým zástupcem řádu šelem, tak je důkazem, že u mláďat masožravců v období mléčné výživy je hodnota bifidobakterií vyšší, ale s přechodem na pevnou stravu se počet bifidobakterií sníží na minimum.

Dalším aspektem, který může ovlivnit výsledek stanovení bakterií ve vzorcích z trávicího traktu je použitá metoda. V bakalářské práci bylo použito kultivační stanovení na selektivních agarech. Selektivní média pro kultivaci bifidobakterií jsou založené na komerčně dostupných agarech jako je Man, Rogosa a Sharpe (MRS), dále Colombia, modifikované Clostridial a Wilkins-Chalgren agary, které jsou doplňovány o antimikrobiální složky nebo kombinaci těchto složek. V těchto médiích je potlačen růst nežádoucích bakterií kromě bifidobakterií antibiotiky, nízkým pH nebo kombinací obou faktorů. Dle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology lze použít ke kultivaci bifidobakterií TPY médium (trypticase phytone yeast extract) doplněné o mupirocin (100 mg/l). Lze vytvořit modifikovaný TPY agar, který je doplněn o mupirocin (100 mg/l) a ledovou kyselinu octovou (1ml/l). Tento agar byl použit pro stanovení bifidobakterií ve vzorcích stolice kojenců (Vlková et al., 2005). Výsledky práce ukazují, že na použitém agaru mohou kromě bifidobakterií růst i klostridie. V praktické části mé práce byl pro stanovení bifidobakterií použit modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přidavkem sójového peptonu (5g/l), cysteinu (0,5 g/l), tweenu 80 (1 ml/l), mupirocinu (100 mg/l) a ledová kyselina octová (1ml/l). U vzorků získaných od fretky domácí a lišky polární nebyly na tomto agaru detekovány bifidobakterie, ale dá se předpokládat, že stanovené bakterie byly klostridie, protože se jednalo o pravidelné tyčinky produkující plyn. Jelikož, jak již bylo zmíněno, mupirocin v kombinaci s ledovou kyselinou octovou potlačuje růst ostatních bakterií, ale nezabraňuje růstu klostridií. Klostridie jsou k mupirocinu rezistentní (Vlková et al., 2015). Pro stanovení počtu laktobacilů byl použit

Rogosa agar, kde selektivně působilo v médiu pH, jehož hodnota byla upravena na 5,4 kyselinou octovou. Tímto způsobem byl podpořen růst laktobacilů, zatímco ostatní bakterie mléčného kvašení byly potlačeny.

V praktické části nebyla provedena druhová identifikace mikroorganismů ze získaných izolátů, bude následovat v diplomové práci.

V mé bakalářské práci jsem se zaměřila na zvířata chovaná v lidské péči. Uměle odchovaná zvířata žijí v zoologických zahradách, národních parcích či zvířecích domech. Přestože se lidé snaží zvířatům v zajetí zajistit potravu, co nejvíce podobnou potravě ve volné přírodě, někdy to není možné, a proto jsou často zvířata krmena náhražkou dané potravy, která je lépe dostupná. Proto zvířata ve volné přírodě mohou mít odlišné složení mikrobity (Geigerová et al., 2014). U zvířat chovaných v zoologických zahradách mohou vzniknout problémy se skladbou komponentů krmné dávky. Krmná dávka musí splňovat živinové potřeby zvířete, jako je obsah makro- i mikronutrientů ve výživě, a zároveň musí zvířeti chutnat. U zvířat narozených v zoologické zahradě většinou nebývá problém s krmnou dávkou, ale u jedinců přivezených z jiných zařízení či z volné přírody, může vzniknout problém, který může ohrozit i život zvířete (Puschmann et al., 2013). Vlivem sociálního napětí ve skupině, působením stresu a nestabilním příjmem potravy může dojít k rozhození činnosti trávicího traktu. V tuto chvíli, jak bylo již dříve zmíněno, je vhodná aplikace probiotik, které ochrání zažívací ústrojí před rozvojem infekčním onemocnění, kterým se v zoologických zahradách a jiných chovech snaží chovatel vždy předejít a zachovat zdraví jedince.

Zvířata, od kterých byly odebírány vzorky, byla zdravá, neměla zažívací či jiné potíže týkající se trávicího traktu. Nebyla jim aplikována probiotika. U masožravých jedinců je možné se domnívat, že nulový výskyt bifidobakterií v trávicím traktu je přirozený v důsledku konzumované potravy, proto není nutné zařadit probiotika jako doplněk stravy. U dvou jedinců, nosála červeného a morčete domácího, u kterých byly bifidobakterie zjištěny, se jedná o odpovídající hodnotu jejich věku, jelikož se jedná o dospělé jedince. Bifidobakterie byly zjištěny u nosála červeného v hodnotách 8,07 log KTJ/g z celkových počtů anaerobů a u morčete domácího se hodnota bifidobakterií pohybovala okolo 7,43 log KTJ/g z celkových počtů anaerobů. V tuto chvíli aplikace probiotik není nutná, vhodné bude zařazení probiotik

při onemocnění gastrointestinálního traktu či jiných střevních potížích, při stěhování nebo nepříznivých klimatických podmínkách jako je např. vlhké počasí.

7 Závěr

V bakalářské práci byl sledován výskyt bifidobakterií a laktobacilů u 4 druhů zvířat chovaných v Zoo Praha. Bifidobakterie byly přítomny ve vzorcích výkalů nosála červeného a morčete domácího a to v počtech kolem 10^8 a laktobacily v počtech kolem 10^7 . U lišky polární a fretky domácí bifidobakterie nebyly nalezeny, počty laktobacilů byly velmi variabilní.

8 Seznam použité literatury

- Biavati, B., Mattareli, P., 2012. Genus I. *Bifidobacterium*. In: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M., E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman W., B. Bergley's manual of Systematic Bacteriology, Second edition, Volume five, The Actinobacteria, Part A. London. 171-224. ISBN: 978-0-387-95043-3
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Killer, J., Musilová, Š. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*. 5. 377.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Killer, J., Kmet, V. 2013. Identification of bifidobacteria isolated from Asian elephant (*Elephas maximus*). *J. Biosci.* 38. 239-243.
- Claesson, M.J., Sinderen, D., O'Toole, P.W. 2007. The genus *Lactobacillus*- a genomic basis for understanding its diversity. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 269. 22-29.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G.F., Sinderen, D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 4-18.
- De Preter, V., Hamer, H.M., Windey, K., Verbeke, K. 2011. The impact of pre- and/ or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? *Molecular Nutrition and Food research*. 55. 46-57.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Schumann, P., Pukall, R., Dicks, L.M.T. 2012. *Bifidobacterium reuteri* 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., Dicks, L.M.T. 2010. Diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in feces of herbivores, omnivores and carnivores. *Anaerobe*. 16. 590-596.
- Gaggia, F., Mattareli, P., Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. 141. 15-28.

- Garcia-Mazcorro, J. F., Minamoto, Y. 2013. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 45. 111-124.
- Geigerová, M., Vlková, E., Skřivanová, E., Bunešová, V. 2014. Odlišnosti v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců. *Veterinářství*. 7. 522-526.
- Godoy-Vitorino, F., Goldfarb, K. C., Karaoz, U., Leal, S., Garcia-Amado, M.A., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., Brodie, E.L., Dominguez-Bello, M.G. 2012. Comparative analyse of foregut and hindgut bacterial communities in hoatzins and cows. *The ISME Journal*. 6. 531-541.
- Hirayama, K., Kawamura, S., Mitsuoka, T., Tashiro, K. 1989. The faecal flora of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Applied Bacteriology*. 67. 411-415.
- Hooper, L. V., Macpherson, A. J. 2010. Immune adaptations that maintain homeostatis with the intestinal microbiota. *Nature Review Immunology*. 10. 159-169.
- Jami, E., Mizhari, I. 2012. Composition and similarity of bovine rumen microbiota Gross individual animals. *PLoS ONE*. 7. 1-7.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., Allsopp, M. H. 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*. 84. 96-103.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Rada, V., Dubná, S., Marounek, M. 2010. Bifidobacteria in digestive tract of bumblebees. *Anaerobe*. 16. 165-170.
- 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.
- Kopečný, J., Mrázek, J., Killer, J. 2010. The presence of Bifidobacteria in Social Insects, Fish and Reptiles. *Folia Microbiologica*. 55. 336-339.
- Kudo, H., Kimura, N., Suzuki, M., Cheng, K.J., Costerton, J.W., Mitsuoka, T. 1989. Electron microscopic, biochemical and physiological studies of *Bifidobacterium pseudolongum* SS-24 and *Bifidobacterium thermophilum* SS-19. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 271. 263-271.

- Lauer, E., Kandler, O. 1983. DNA- DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*. 4. 42-64.
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C. A., Knight, R., Gordon, J.I. 2008. Worlds Within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Review Microbiology*. 6. 776-786.
- Lugli, G. A., Duranti, S., Milani, Ch., Turrowi, F., Viappiani, A., Mangifesta, M., Sinderen, D., Ventura, M. 2014. The Genome Sequence of *Bifidobacterium moukalabense* DSM 27321 Highlights the Close Phylogenetic Relatedness with the *Bifidobacterium dentium* Taxon. *Genome Announcement*. 2. E00048-14.
- Macferlane, G.T., Steed, H., Macferlane, S. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galactooligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 104. 305-344.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V.D., Sokol, H., Dore, J., Corthier, G., Furet, J.P. 2009. The Firmicutes/ Bacteroidetes ration of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*. 9. 1-6.
- Modesto, M., Michelini, S., Stefanini, I., Ferrara, A., Tacconi, S., Biavati, B., Mattarelli, P. 2014. *Bifidobacterium aesculapii* sp. nov., from faeces of the baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64. 2819-2827.
- Modesto, M., Michelini, S., Stefanini, I., Sandri, C., Spiezio, C., Pisi, A., Filippini, G., Biavati, B., Mattarelli, P. 2015. *Bifidobacterium lemurum* sp. nov., from faeces of the ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65. 1726-1734.
- Nelson, T. M., Rogers, T. L., Brown, M. V. 2013. The gut bacterial community of mammals from marine and terrestrial habitats. *PLoS ONE*. 8. 1-8.
- Nelson, T.M., Rogers, T.L., Carlini, A.R., Brown, M.V. 2012. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Evolutionary and Ecology Research Center*. 15. 1132-1145.

- O'Connor, E.M., O'Herlihy, E.A., O'Toole, P.W. 2014. Gut microbiota in older subjects: variations, health consequences and dietary intervention prospects. *Proceedings of the Nutrition Society*. 73. 441-451.
- Palmer, Ch., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., Brown, P.O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*. 5. 1556-1573.
- Praet, J., Meeus, I., Cnockaert, M., Aerts, M., Smagghe, G., Vandamme, P. 2015. *Bifidobacterium commune* sp. nov. Isolated from the bumble bee gut. *Antonie van Leeuwenhoek*. 107. 1307-1313.
- Puschmann, W., Zscheile, D., Zscheile, K. 2013. *Savci, chov zvířat v ZOO. ZOO Dvůr Králové*. ISBN: 978-80-905184-3-8.
- Rada, V., Petr, J. 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Veterinary Medicine- Czech*. 47. 1-4.
- Suchodolski, J. S. 2011. Intestinal microbiota of Dogs and Cats: a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 41. 261-272.
- Touhy, K.M., Rouzaud, G.C.M., Brück, W.M., Gibson, G.R. 2005. Modulation of the Human Gut Microflora Towards Improved Health- Using Prebiotics- Assesment of Efficacy. *Current Pharmaceutical Design*. 11. 75-90.
- 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*. 63: 000-000.
- Ullrich, M. 2000. *Fretka, všechno o chovu fretky*. Kosmos. ISBN 80-7181-862-3
- Ventura, M., Canchaya, M., Fitzgerald, G.F., Gupta, R.S., van Sinderen, D. 2007. Genomics as means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91. 351-372.

- Vlková, E., Salmonová, H., Bunešová, V., Geigerová, M., Rada, V., Musilová, Š. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe*. 34. 27-33.
- Vlková, E., Nevoral, J., Jencikova, B., Kopečný, J., Godefrooij, J., Trojanová, I., Rada, V. 2005. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods*. 60. 365-373.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I., Killer, J., Šmehilová, M., Molatová, Z. 2008. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Archives of Animal Nutrition*. 62. 359-365.
- Voreades, N., Kozil, A., Weir, T.L. 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in Microbiology*. 5. 40-46.