

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Variabilita bifidobakterií ve střevní mikrobiotě *Sus scrofa***

**Diplomová práce**

**Bc. Adéla Uherková**

**Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů**

**Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Variabilita bifidobakterií ve střevní mikrobiotě *Sus scrofa*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Nikol Modráčkové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, ochotu a věnovaný čas při zpracování této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostoru a pomoci při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině a nejbližším za podporu a pomoc v průběhu celého studia.

# Variabilita bifidobakterií ve střevní mikrobiotě *Sus scrofa*

## Souhrn

Bifidobakterie běžně obývají gastrointestinální trakt savců a jsou spojovány s pozitivními účinky na zdraví svého hostitele. Přispívají také ke vstřebávání živin a zlepšují odolnost jedince vůči chorobám. Některé druhy bifidobakterií jsou multihostitelské, zatímco jiné se specializují na konkrétní hostitele. U prasat (*Sus scrofa*) se bifidobakterie vyskytují jako součást jejich střevní mikrobioty a některé druhy jsou dokonce pro prasečího hostitele specifické. U divokých prasat se bifidobakterie nachází ve vyšším počtu než u prasat domácích, nicméně ta vykazují jejich vyšší druhovou diverzitu, patrně díky domestikovanému způsobu života či interakcím s lidmi. Zastoupení a druhová variabilita bifidobakterií mohou být u prasat ovlivněny mnoha faktory, jako je způsob chovu, prostředí, domestikace, strava, genetika a další.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo zidentifikovat kmeny bifidobakterií izolované ze střevní mikrobioty divokých a domácích prasat metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií a vybrané izoláty dále charakterizovat fingerprintovou metodou REP-PCR. Detekováno bylo celkem 9 různých druhů bifidobakterií. Nejčastěji detekovanými druhy u prasečího hostitele byly *B. thermophilum*, *B. apri* a *B. boum*. Zastoupení některých druhů se u divokých a domácích prasat lišilo. Pro divoká prasata byla typická přítomnost druhu *B. apri*, zatímco pro prasata domácí *B. animalis*. Naopak druhy *B. thermophilum*, *B. boum* a *B. porcinum* byly běžně detekovány u obou dvou skupin. Pravděpodobně tedy představují hostitelsky specifické druhy pro prasata, druh *B. apri* dokonce jenom pro divoká. Tyto výsledky byly potvrzeny i z pohledu lokalit. Některé druhy byly typické pouze pro určitou oblast (*B. apri*), zatímco jiné byly široce rozšířené mezi téměř všemi sledovanými lokalitami (*B. thermophilum*). Detekován byl i vliv pohlaví hostitele, kdy samice obou skupin vykazovaly vyšší druhovou variabilitu než samci. Zároveň byla taktéž zjištěna vysoká kmenová variabilita u druhů *B. thermophilum* a *B. apri* při hodnocení fingerprintových profilů. Tyto variabilní kmeny by mohly představovat fylogeneticky příbuzné druhy či ještě neobjevené poddruhy. Naopak v rámci druhu *B. animalis* byly odhaleny geneticky podobné kmeny napříč lokalitami.

MALDI-TOF MS s rozšířenou databází se osvědčila jako vhodný nástroj pro určení velkého množství variabilních druhů bifidobakterií u izolátů prasečího původu, stejně tak fingerprintová metoda REP-PCR s primerem GTG<sub>5</sub> pro hodnocení jejich kmenové variability. Do budoucna je nicméně nezbytné další testování se zapojením různých metod pro ověření výstupů a získání komplexnějších informací. Znalost bifidobakterií přítomných ve střevě divokých a domácích prasat je důležitá nejen z hlediska ekologické distribuce těchto bakterií, ale i z praktických důvodů. Některé bifidobakterie by mohly jako probiotika zlepšit produkční parametry v chovu prasat či přispět k následnému zisku kvalitnějších masných produktů. Proto je hledání hostitelsky specifických kmenů pro prasata s tímto potenciálem žádoucí.

**Klíčová slova:** Střevní mikrobiom; prase divoké; prase domácí; *Bifidobacterium*; MALDI-TOF MS, REP-PCR

# Bifidobacterial variability in the gut microbiota of *Sus scrofa*

## Summary

Bifidobacteria are commonly found in the gastrointestinal tract of mammals and have been associated with positive health effects in their hosts. They also aid in nutrient absorption and can improve resistance to diseases. Some bifidobacterial species are multihost, while others are host-specific. In pigs (*Sus scrofa*), bifidobacteria are a part of their gut microbiota, and some species are even specific for this host. Wild pigs have a higher number of bifidobacteria compared to domestic ones. However, domestic pigs exhibit greater species diversity, which is likely due to their domesticated lifestyle or interactions with humans. The abundance and species variability of bifidobacteria in pigs can be influenced by many factors, including farming methods, environment, domestication, diet, genetics, and others.

The practical section of this thesis aimed to identify bifidobacterial strains isolated from the gut microbiota of wild and domestic pigs using MALDI-TOF mass spectrometry with an extended database for bifidobacterial identification. Then, the selected isolates were characterized using REP-PCR fingerprint method. A total of 9 different bifidobacterial species were detected, with *B. thermophilum*, *B. apri*, and *B. boum* being the most frequently detected species in porcine hosts. The presence of some species differed between wild and domestic pigs. *B. apri* was typical in wild pigs, while *B. animalis* was typical in domestic pigs. In contrast, *B. thermophilum*, *B. boum*, and *B. porcinum* were commonly found in both groups and likely represent host-specific species for pigs, with *B. apri* being exclusive for wild pigs. The results were also confirmed in terms of localities, where certain species were specific to particular areas (*B. apri*), while others were distributed widely among almost all areas (*B. thermophilum*). The effect of host sex was also observed, with females from both groups showing higher species variation than males. Additionally, high strain variability was detected in *B. thermophilum* and *B. apri* species when assessing fingerprint profiles. These variable strains could potentially represent phylogenetically related species or undiscovered subspecies. In contrast, *B. animalis* strains were genetically similar across different locations.

The use of MALDI-TOF MS with an extended database proved to be a suitable tool for identifying a large number of variable bifidobacterial species of porcine origin. The REP-PCR fingerprint method with the GTG<sub>5</sub> primer was also effective in evaluating their strain variability. However, further testing involving different methods is necessary for the future to validate the results and obtain more comprehensive information. The knowledge of bifidobacteria present in the intestine of wild and domestic pigs is important not only for understanding the ecological distribution of these bacteria but also for practical reasons. As probiotics, certain bifidobacteria could improve production parameters in pig production or contribute to the subsequent production of better-quality meat products. Therefore, the search for host-specific strains for pigs with this potential is desirable.

**Keywords:** Gut microbiome; wild boar; domestic pig; *Bifidobacterium*; MALDI-TOF MS, REP-PCR

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Bakterie čeledi <i>Bifidobacteriaceae</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Evoluce, výskyt a rozšíření .....	12
<b>3.3 Prase divoké a domácí .....</b>	<b>15</b>
3.3.1 Gastrointestinální trakt <i>Sus scrofa</i> .....	15
3.3.2 Střevní mikrobiota <i>Sus scrofa</i> .....	16
3.3.3 Bifidobakterie ve střevě prasat .....	20
3.3.4 Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty prasat .....	21
3.3.4.1 Strava.....	22
3.3.4.2 Prostředí.....	32
3.3.4.3 Domestikace .....	32
3.3.4.4 Hostitel .....	33
<b>3.4 Metody charakterizace bifidobakterií izolovaných ze střevní mikrobioty</b>	<b>34</b>
3.4.1 Kultivace a izolace DNA .....	34
3.4.2 Fenotypová charakterizace .....	34
3.4.3 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie .....	35
3.4.4 Genotypová charakterizace.....	38
3.4.4.1 Metoda PCR .....	39
3.4.4.2 Fingerprintové metody .....	40
3.4.4.3 Sekvence genu 16S rRNA .....	41
3.4.4.4 Celogenomové sekvenování .....	42
<b>4 Metodika .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Příprava kultur bifidobakterií.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 MALDI-TOF MS identifikace .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Fingerprintová metoda REP-PCR .....</b>	<b>46</b>
4.3.1 Izolace DNA a PCR.....	46
4.3.2 Agarózová gelová elektroforéza .....	47
4.3.3 Vizualizace PCR produktu a shluková analýza .....	47
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1 Identifikace bifidobakterií pomocí MALDI-TOF MS.....</b>	<b>48</b>
5.1.1 Úspěšnost identifikace bifidobakterií .....	48
5.1.2 Druhové zastoupení bifidobakterií u divokých a domácích prasat.....	49
<b>5.2 REP-PCR charakterizace.....</b>	<b>55</b>

<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Seznam tabulek a obrázků .....</b>	<b>77</b>

# 1 Úvod

Živočišná a bakteriální říše se po stovky milionů let vyvíjely společně a přizpůsobovaly se tak, aby navazovaly mezidruhové vztahy (Kostic et al. 2013). Zvířecí gastrointestinální trakt skrývá složitou mikrobiální síť. Složení střevní mikrobioty odráží neustálou koevoluci těchto mikroorganismů s jejich hostitelským prostředím (Ley et al. 2006). Rozšířenou a hojnou skupinou bakterií ve střevech savců jsou bifidobakterie (Rodriguez & Martiny 2020). Jsou považovány za nepatogenní komenzální probiotické bakterie, jejichž přítomnost v gastrointestinálním traktu je spojována s různými zdravotními přínosy (O'Callaghan & van Sinderen 2016).

Bifidobakterie se vyskytují v mikrobiotě řady teplokrevných živočichů (Bunesova et al. 2014), včetně typického hostitele *Sus scrofa* (Simpson et al. 2004b; Gavini et al. 2006; Mikkelsen et al. 2003; Pechar et al. 2017b), který má nejen komerční význam v chovu zvířat, ale je i důležitým biomedicínským modelem člověka (Shang et al. 2022). Je také ideálním modelem savce pro odhalení původu a evoluce střevní mikrobioty specifické pro hostitele, jelikož pro srovnání je k dispozici jeho přímý divoký předek a blízcí fylogenetičtí sousedé (Ushida et al. 2016). Střevní mikrobiota prasat je velmi důležitá pro výživu, energii, imunitu i jejich fyziologický stav. Zároveň plemeno, věk, tělesná hmotnost, strava, genetika, prostředí a další faktory způsobují změny ve střevní mikrobiotě (Kim & Isaacson 2015).

Přítomnost bifidobakterií ve střevě prasat hraje významnou roli. Dle Modesto et al. (2009) byly navíc schopny svou přítomností modulovat složení celkové střevní mikrobioty prasat. Přičemž samotný růst a metabolická aktivita bifidobakterií mohou být selektivně stimulovány různými prebiotickými sacharidy (Gibson 2008; Ventura et al. 2007c).

Modulace střevní mikrobioty pomocí probiotických bakterií či prebiotik by mohla být jedním z možných způsobů, jak bojovat proti střevním poruchám a přispět tak k podpoře zdraví jedince (Duranti et al. 2020), také s možným efektem na kvalitu konečného masného výrobku pro spotřebitele (Chang et al. 2018). Proto monitoring výskytu druhového zastoupení bifidobakterií u domácích a divokých prasat má vysoký potenciál nejen pro samotné hostitele a jejich chovatele, ale nepřímo také pro konzumenta vepřového masa.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Bifidobakterie jsou komenzální skupinou probiotických bakterií vyskytující se napříč živočišnou říší. Předpokládáme, že prostředí (volná příroda, lokalita a chov), ve kterém žijí jedinci *Sus scrofa*, ovlivňuje druhové zastoupení bifidobakterií v jejich střevní mikrobiotě.

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na základě aktuálních vědeckých poznatků o rodu *Bifidobacterium* v souvislosti se střevní mikrobiotou *Sus scrofa*. Dále bylo cílem identifikovat izoláty bifidobakterií ze sbírky divokých kmenů získaných ze střevní mikrobioty divokých a domácích prasat pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a v neposlední řadě tyto izoláty genotypově charakterizovat fingerprintovou metodou REP-PCR.

### 3 Literární rešerše

Mikroorganismy se objevily asi před 3,5–3,8 miliardami let, tedy pouhou miliardu let po vzniku Země. Od té doby se mikrobům daří mimořádně dobře. Jejich celkový počet na Zemi se odhaduje na  $4\text{--}6 \times 10^{30}$  KTJ (Tuson & Weibel 2013).

Bakterie zaujímají na Zemi širokou škálu ekologických nik. Jejich dlouhá evoluční historie je vystavila velmi různorodým ekosystémům. Vyvinula se u nich pozoruhodná schopnost přizpůsobit se okolnímu prostředí v reakci na měnící se podmínky. Bakterie jsou schopny detekovat chemické, tepelné a mechanické podněty či elektrické a magnetické pole a následně na ně reagovat (Persat et al. 2015). Mají zásadní vliv na evoluci a ekologii živočichů, ovlivňují jejich genom, vývoj a fyziologii (McFall-Ngai et al. 2013). Předpokládá se, že fyziologie hostitele a jeho strava denně působí na složení společenstev bakterií v jeho střevě. Zároveň je složení mikroorganismů ovlivňováno také evoluční historií v mnohem delším časovém horizontu. Velkou výzvou ve výzkumu mikrobiomu zvířat i lidí je proto oddělit ekologické a evoluční procesy, které jsou základem variability střevních mikroorganismů. Jedním z přístupů k řešení těchto otázek je zaměřit se na určitou skupinu bakterií v rámci širšího společenství mikroorganismů žijící ve střevě (Rodriguez & Martiny 2020).

Pro reálný popis bakterií je třeba začlenění různých podnětů reprezentativní pro jejich přirozené prostředí. Takové analýzy jsou rozhodující pro komplexní pochopení jejich biologických procesů. Tím lze dosáhnout pokroku v omezování životaschopnosti bakterií nebo naopak podpoře jejich růstu v lékařství, průmyslu či zemědělství (Persat et al. 2015).

#### 3.1 Bakterie čeledi *Bifidobacteriaceae*

V současnosti čeleď *Bifidobacteriaceae* spadá do kmene Actinobacteria a zahrnuje rod *Bifidobacterium*, *Gardnerella* a osm tzv. scardoviálních rodů, konkrétně *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bombiscardovia*, *Galliscardovia*, *Neoscardovia*, *Parascardovia*, *Pseudoscardovia* a *Scardovia* (Mekadim et al. 2019).

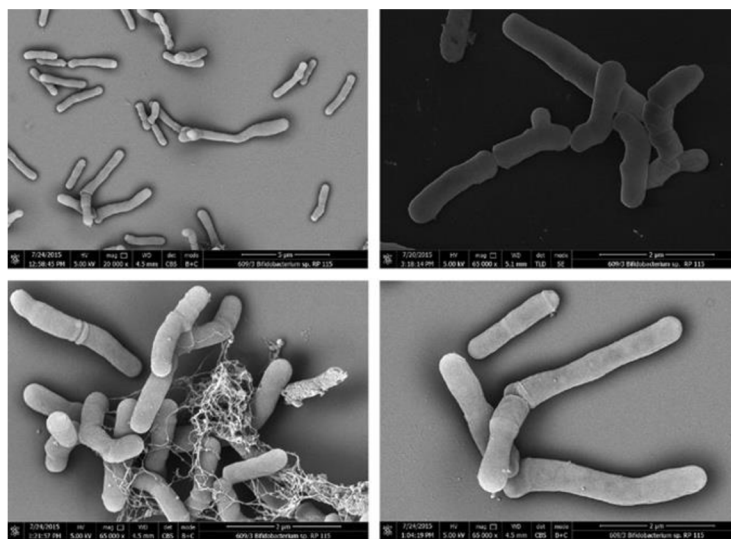
Bakterie čeledi *Bifidobacteriaceae* jsou pleomorfní nepohyblivé tyčinky, které se vyskytují buď jednotlivě, nebo se seskupují do řetízků a shluků. Jedná se o grampozitivní bakterie s výjimkou *Gardnerella vaginalis*, která může být grampozitivní i gramnegativní. Buňky jsou nepohyblivé, bez pouzdra a netvoří spory. Bakterie této čeledi mohou být buď anaerobní, nebo fakultativně anaerobní. Za přítomnosti oxidu uhličitého jsou však některé anaerobní bifidobakteriální druhy schopny kyslík tolerovat (Biavati & Mattarelli 2006). Podíl guanino-cytosinového komplementárního páru (DNA G+C) se u nich pohybuje od 42 do 67 mol %. Rod *Bifidobacterium* vykazuje poměrně vysoký obsah DNA G+C v rozmezí 53 až 67 mol % (Killer et al. 2010).

Rostoucí pozornost věnována rodu *Bifidobacterium* souvisí především s úlohou prospěšných komenzálních druhů bifidobakterií. Ovlivňují fyziologii hostitele a podílejí se na udržení rovnováhy gastrointestinálního traktu lidí (Biavati & Mattarelli 2018). I přes to však mohou být bifidobakterie spojovány s výskytem zubních kazů (Scardovi & Crociani 1974) a infekcí močových cest (Barberis et al. 2011).

### 3.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly poprvé objeveny H. Tissierem, který izoloval bakterie se zvláštním a charakteristickým tvarem písmene Y ze stolice kojenců. Nazval je *Bacillus bifidus* (Tissier 1899). Tyto bakterie byly nejprve zahrnuty do rodu *Lactobacillus* vzhledem k jejich podobnosti s tímto rodem (Breed et al. 1957). Až posléze v osmém vydání Bergey's Manual of Determinative Bacteriology v roce 1974 byla uznána existence rodu *Bifidobacterium* jako samostatného taxonu (Buchanan et al. 1974).

Jedná se o nepohyblivé tyčinky různého vzhledu, obvykle zakřivené a často rozvětvené. Čerstvě izolované kmeny mohou mít formy od uniformních, rozdvojených (vzhled písmene Y a V), lopatkovitých či kyjovitých, až po rozvětvené tvary. V nepříznivých podmínkách prostředí bifidobakterie vykazují vícenásobné větvení a vysoký buněčný pleomorfismus, ačkoli ve svém přirozeném prostředí mají většinou tyčinkovitý tvar (Leahy et al. 2005). Příklad detailní buněčné morfologie znázorňuje **Obrázek 1**. Pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu je zde zachycen konkrétní druh *B. apri*, který byl kultivován anaerobně v TPY bujónu. Podobná morfologie byla dokumentována také pro nejbližší příbuzné termofilní bifidobakterie: *B. thermophilum* a *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* (Pechar et al. 2017b).



Obrázek 1: Buněčná morfologie *Bifidobacterium apri* pomocí elektronového mikroskopu (Pechar et al. 2017b)

Morfologie bifidobakteriálních buněk může být ovlivněna řadou faktorů během jejich kultivace. Bylo prokázáno, že množství *N*-acetylglukosaminu, alaninu, kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, serinu a  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v růstovém médiu ovlivňuje jejich tvar buněk (Ventura et al. 2004). Při subkultivaci v médiu s nadbytkem *N*-acetylglukosaminu, který je základním prekurzorem biosyntézy peptidoglykanu, mají buňky bifidobakterií pravidelnější formu. Naopak při nedostatku *N*-acetylglukosaminu buňky vytváří rozvětvené formy (Biavati et al. 2000).

Bifidobakterie jsou běžně popisovány jako striktně anaerobní bakterie (Turroni et al. 2011). Avšak jejich stupeň citlivosti ke kyslíku se může mezi kmeny a druhy velmi lišit (Kawasaki et al. 2006). Tolerance ke kyslíku u bifidobakterií závisí na přítomnosti souboru

NADH oxidáz, které redukují kyslík na vodu nebo peroxid vodíku. To umožňuje některým bifidobakteriím růst také v přítomnosti nízkých koncentrací kyslíku. Aerotolerantními bifidobakteriemi jsou například druhy *B. animalis*, *B. thermophilum*, *B. boum*, *B. minimum* či *B. psychraerophilum* (Ladero & Sánchez 2017). Optimální růstová teplota lidských bifidobakterií se pohybuje mezi 36 a 38 °C, zatímco u druhů živočišného původu je o něco vyšší, přibližně 41–43 °C (Bunesova et al. 2014). Minimální teplota pro růst se uvádí kolem 25–28 °C. Výjimkou je druh *B. mongoliense*, jež může růst i při 15 °C a také prasečí druh *B. psychraerophilum* při 8 °C (Biavati & Mattarelli 2015). Naopak u všech zástupců termofilní skupiny (*B. apris*, *B. boum*, *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* a *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum*) byla prokázána schopnost růstu při teplotách až 49–50 °C (Pechar et al. 2017b). Optimální pH pro počáteční růst je 6,5–7,0. Při pH 4,5–5,0 nebo pH 8,0–8,5 bifidobakterie většinou nerostou s výjimkou *B. thermacidophilum*, který snáší pH 4,5 (Biavati & Mattarelli 2015).

Bifidobakterie se hojně nachází zejména v dolních částech tlustého střeva. Za svůj ekologický úspěch vděčí své schopnosti metabolizovat komplexní sacharidy (Ventura et al. 2007b). Degradace nestravitelných sacharidů představuje jeden ze způsobů, jak zajišťují bifidobakterie a další střevní komenzálové svou kolonizaci a perzistenci ve střevě (Bottacini et al. 2017).

### 3.2.1 Evoluce, výskyt a rozšíření

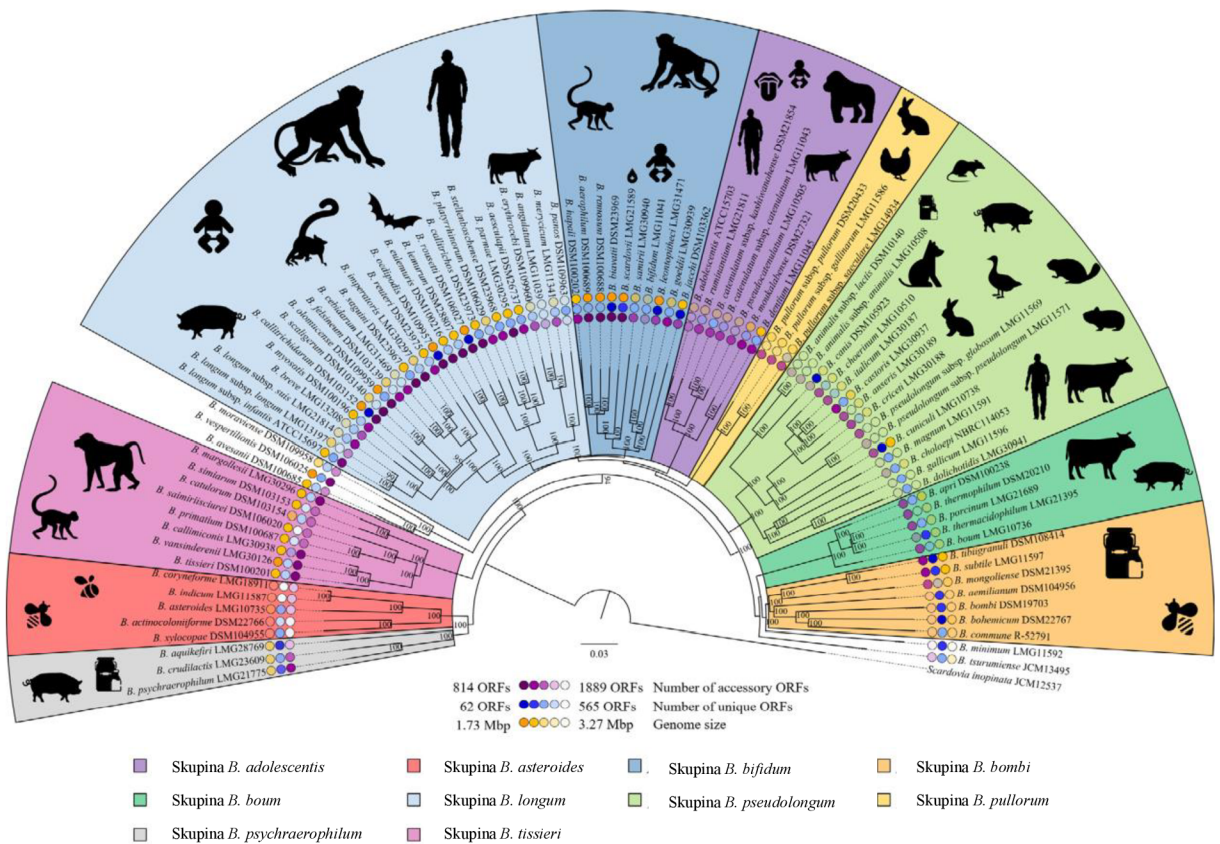
Hmyz se po Zemi pohyboval mnohem dříve než savci, proto lze tvrdit, že by mohl být původním hostitelem bifidobakterií (Bottacini et al. 2012). Statistické testy potvrdily, že lidské izoláty bifidobakterií jsou mnohem mladší než izoláty získané ze včel. Lze tedy očekávat, že bifidobakterie se během raného vývoje přizpůsobily včelám a poté se rozšířily i mezi lidské hostitele (Sun et al. 2015). Rozsáhlá fylogenetická analýza odhalila, že druh *B. asteroides* izolovaný ze střeva hmyzu pravděpodobně představuje druh nejbližší příbuzný prapředku rodu *Bifidobacterium* (Turroni et al. 2011). Ve srovnání s ostatními druhy totiž obsahuje odlišné glykosidázy odrážející jeho metabolické chování vůči jednoduchým sacharidům vyskytujících se ve střevě včel medonosných. To nasvědčuje jeho delší historii adaptace na své hostitele. Tato hostitelská specifita druhů příbuzných *B. asteroides* může představovat potenciální cenné kandidáty na probiotika příští generace pro včely (Lugli et al. 2022).

Kombinací sekvenování genomu a izolací bakterií došlo k identifikaci a charakterizaci více než 100 různých druhů bifidobakterií. Je pozoruhodné, že za posledních 10 let bylo popsáno více druhů bifidobakterií než v předchozím století (Lugli et al. 2022). Počínaje identifikací prvního druhu *Bifidobacterium bifidum* v roce 1899 (Tissier 1899). Aktuálně ke dni 17. 3. 2023 bylo popsáno 117 druhů a 18 poddruhů bifidobakterií (databáze bacterio.net). A tento seznam se stále rozrůstá.

Mnoho nově popsaných bifidobakteriálních druhů je spojeno s gastrointestinálním traktem primátů a většina z těchto druhů byla izolována z novosvětských opic, jako jsou kosmani a tamarini, uvádí Neuzil-Bunesova et al. (2021). Studium mikrobioty primátů poskytuje důležité poznatky o podobnosti jejich vlastností u člověka (Michelini et al. 2016).

V nedávné době bylo izolováno 5 nových druhů bifidobakterií z výkalů primátů v českých zoologických zahradách. Nově izolované *B. panos* a *B. erythrocebi* jsou prvními druhy bifidobakterií identifikované u šimpanzů a kočkodanů. Zároveň vykazují vysokou genotypovou podobnost s bifidobakteriálními druhy typickými pro lidi. *B. oedipodis*, *B. moraviense* a *B. olomucense* byly izolovány z tamarinů (Neuzil-Bunesova et al. 2021). Čeleď kosmanovití (*Callitrichidae*) má dle Malukiewicz et al. (2022) nejvyšší průměrnou četnost bifidobakterií ve střevním mikrobiomu primátů (> 30 %). Uvádí, že mezi touto čeledí primátů a bifidobakteriemi by mohl existovat důležitý evoluční vztah.

Bifidobakterie se přirozeně vyskytují v gastrointestinálním traktu savců i lidí. Izolovány byly také z lidské krve (Hoyles et al. 2002), močového traktu, vaginálního prostředí a ústní dutiny člověka, z odpadních vod, fermentovaného mléka (Biavati & Mattarelli 2009) či z dolní části trávicího traktu ptáků a společenského hmyzu (Alessandri et al. 2021). Jednotlivé hostitele ve fylogenetickém stromu bifidobakterií znázorňuje **Obrázek 2** a souvisí přímo či nepřímo s prostředím lidského nebo zvířecího střeva. Přičemž výskyt bifidobakterií v odpadních vodách, ústní dutině a mléce je pravděpodobně důsledkem kontaminace z jejich původního přirozeného zdroje, tedy gastrointestinálního traktu (Turroni et al. 2011). Jejich rozšíření naznačuje, že bifidobakterie jsou obecně přítomny u mnohobuněčných organismů vychovávající své potomstvo (savci, ptáci, sociální hmyz). Je tedy možné, že takové šíření bifidobakterií je důsledkem přímého přenosu bifidobakteriálních buněk z rodiče na potomstvo (Ventura et al. 2014).



Obrázek 2: Fylogenetický strom rodu *Bifidobacterium*, upraveno dle Alessandri et al. (2021)

Pokud jde o člověka, bifidobakterie jsou prvními bakteriálními kolonizátory gastrointestinálního traktu novorozenců (Satti et al. 2021) a zároveň jedním z nejhojněji zastoupených bakteriálních rodů přítomných v lidském střevě během rané fáze života. Bylo prokázáno, že bifidobakterie se mohou zapojit do vertikálního přenosu, ke kterému dochází mezi matkou a novorozencem během porodu a pravděpodobně i následným kojením. Tento fascinující jev se vyskytuje nejen u lidí, ale také u jiných druhů savců (Duranti et al. 2020). V dospívání a následné dospělosti dochází k poklesu četnosti bifidobakterií a změně biodiverzity. V tomto okamžiku se bifidobakteriální komunita stabilizuje až do stáří, což potvrzuje její důležitou roli během celého života (Alessandri et al. 2021).

Díky rozšíření bifidobakterií existují multihostitelské druhy s kosmopolitním způsobem života. Například druh *B. longum* byl izolovaný z výkalů lidí i zvířat. Také *B. animalis* a *B. pseudolongum* byly nalezeny u různých druhů zvířat (Satti et al. 2021). *B. breve*, který byl do té doby spojován pouze s lidským střevem, byl prokázán také u domestikovaných zvířat (Duranti et al. 2020). *B. asteroides* či *B. bombi*, bifidobakterie vysoce specializované na kolonizaci střeva hmyzu, se ukázaly být široce rozšířené mezi různými savčími hostiteli (Milani et al. 2017). *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* a *B. pseudolongum* jsou obecně všudypřítomné a nejhojněji zastoupené bifidobakteriální taxony. Dříve byly identifikovány jako specializované na určitou niku. Nyní však víme, že jsou schopny kolonizovat široký počet variabilních savčích hostitelů (Milani et al. 2017).

Bifidobakterie si vyvinuly specifické soubory kooperativního chování mezi ostatními kolonizátory, které působí jako silné evoluční hnací síly ve střevní mikrobiotě savců (Milani et al. 2017). Bifidobakteriální druhy se nevyvíjely individuálně směrem k adaptaci na specifické prostředí, ale spoléhaly se na spolupráci s ostatními mikroby, aby dosáhly kolonizace širšího spektra různých hostitelů (Rios-Covian et al. 2015). Několik druhů bifidobakterií je dokonce schopno kolonizovat střevní trakt masožravých savců, ačkoli jejich strava obsahuje pouze omezené množství preferovaného zdroje energie bifidobakterií. To vyvrací dříve navrhované chování specializované na niku či hostitele. Tato úspěšná adaptace bifidobakterií na různé ekologické niky je přisuzována specifickým vlastnostem tohoto taxonu. Rozsáhlé a různorodé metabolické schopnosti umožňují bifidobakteriím přístup k velkému množství jednoduchých i složitých sacharidů pocházejících z potravy a od hostitele. Tyto vlastnosti se pravděpodobně v průběhu času vyvinuly tak, aby zajistily jejich úspěšnou adaptaci a odolnost v savčím gastrointestinálním traktu (Alessandri et al. 2021). Celkově se zdá, že sestava bifidobakterií v jejich biotopech je určena kombinací ekologických a evolučních sil. Bifidobakterie tak nabízí model pro studium těchto procesů v mikrobiomech živočichů (Rodriguez & Martin 2020).

Bylo prokázáno, že některé druhy bifidobakterií jsou specifické jak pro hostitele, tak pro ekologickou niku. Příklady hostitelsky specifických druhů jsou *B. breve* u člověka, *B. roussetti* u netopýra či *B. reuteri* u kosmana (Satti et al. 2021). Adaptované druhy pro konkrétní zvířata jsou i *B. cuniculi* pro králíky, *B. angulatum* pro krávy nebo *B. gallinarum* pro kuřata (Duranti et al. 2020). Pro prasata je specifickým druhem *B. psychraerophilum* (Simpson et al. 2004b). Bifidobakterie si také mohly vyvinout kmenově specifickou adaptaci na konkrétní hostitele v důsledku dlouhodobé koevoluce (Milani et al. (2017). Adaptace bifidobakterií na své hostitele se odráží v evoluční historii společného jádra genomu i ve složení jejich akcesorních

genů a specifických genových sad. Specializace bifidobakterií na hostitelský druh je primárně určována vertikálně děděnými znaky (Rodriguez & Martiny 2020).

Koevoluce hostitele a jeho mikrobioty mezi nimi vytvořila vzájemně prospěšný vztah a mikrobiální komunita se tak stala nepostradatelnou pro metabolismus a zdraví hostitele (Splíchalová et al. 2020). V posledních letech jsme byli svědky rostoucího počtu studií zaměřených na složení střevní mikrobioty prasat. Přičemž byly nakresleny korelace mezi tímto složením a průměrným denním přírůstkem hmotnosti prasat, účinností konverze krmiva a jejich příjmem (Yang et al. 2020). Bifidobakterie představují také původní obyvatelé prasat (Biavati & Mattarelli 2006). Divoká prasata patřila mezi první divoká zvířata, která byla domestikována prvními lidmi (Larson et al. 2005). Proto se euroasijská divoká prasata zdají být vhodným modelem pro evoluční a genetické studie bifidobakterií u prasat domácích. Představují předky většiny plemen domácích prasat. Tudiž by jejich bifidobakteriální populace mohla představovat fylogenetický archetyp, z něhož se vyvinuly bifidobakterie vyskytující se u prasat domácích (Pechar et al. 2017a).

### 3.3 Prase divoké a domácí

Prase divoké (*Sus scrofa scrofa*) je jedním z nejpočetnějších kopytníků v Evropě a suchozemským savcem s nejširším zeměpisným rozpětím. Tento všežravý a ekologicky přizpůsobivý druh se vyskytuje v prostředí mírného a tropického pásma od lesů, bažin a pastvin až po polopouště (Niedziałkowska et al. 2021). Prase domácí (*Sus scrofa domesticus*) se vyvinulo z divokých prasat přibližně před 10 000 lety v Eurasii v důsledku zemědělské činnosti člověka (Ushida et al. 2016).

#### 3.3.1 Gastrointestinální trakt *Sus scrofa*

Gastrointestinální trakt (GIT) je funkčně a anatomicky rozmanitý orgán zahrnující ústa, jícen, žaludek, tenké střevo, tlusté střevo a konečník (Patil et al. 2020). Střevo vykazuje různé funkce včetně absorpce živin, absorpce a sekrece elektrolytů (a vody), sekrece mucinu a imunoglobulinů. Podílí se také na selektivní bariérové ochraně proti škodlivým antigenům a patogenům (Lalles et al. 2004).

Trávení živin v GIT prasat zjednodušeně zahrnuje enzymatickou hydrolýzu a mikrobiální fermentaci potravy. Přestože se prasata do značné míry spoléhají na proces hydrolýzy živin pomocí endogenních trávicích enzymů, mikrobiální fermentace k němu přispívá velkou měrou (Liao & Nyachoti 2017). U monogastričních zvířat je nejdůležitějším místem, kde probíhá fermentace, slepé a tlusté střevo. Nestrávená potrava je metabolizována lokální mikrobiotou. Koncentrace konečných produktů bakteriální fermentace, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), amoniak a plyny včetně H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub>, odráží aktivitu střevní mikrobioty. Přičemž právě mikrobiota určuje správný průběh procesů v GIT (Pecka-Kielb et al. 2016). GIT je nejen největším rozhraním mezi vnějším a vnitřním prostředím živočichů, ale obsahuje také nejvyšší množství a rozmanitost mikroorganismů (Patil et al. 2020).

Prase domácí trávi a vstřebává více potravy než prase divoké. A to díky prodloužení tenkého střeva a zvětšení jeho povrchu. Trávicí procesy u domácích prasat probíhají pravděpodobně pomaleji a kontinuálněji s menším výdejem energie. Poskytují však více látek pro intenzivní biosyntézu bílkovin, než tomu je u prasete divokého. Kratší tenké střevo prasete divokého s menším povrchem vykazuje vyšší metabolickou aktivitu. Fyziologie tenkého střeva se navíc musí přizpůsobit odlišné nabídce potravy, která vyžaduje stálou pohotovost trávení a vstřebávání (Uhr 2014). Přestože divoká prasata dávají přednost potravě s vysokým obsahem bílkovin, ve srovnání s prasetem domácím mají lépe vyvinuté tlusté střevo. To by mohlo naznačovat jeho významný podíl na trávení sacharidů (Pecka-Kiełb et al. 2016).

### 3.3.2 Střevní mikrobiota *Sus scrofa*

Mikrobiota GIT je definována jako komplexní společenství tvořené komenzálními a potenciálně patogenními mikroorganismy obývající střevo savců (Patil et al. 2020). Zahrnuje viry, bakterie, archea, houby, kvasinky a prvoky (Splíchalová et al. 2020).

V GIT savců bylo objeveno přibližně 1000 druhů bakterií (Kim & Isaacson 2015). Ve zdravém střevě si určité druhy udržují stálý počet, který přispívá k opětovnému využití některých živin a produkci vitaminů. Kromě toho mohou účinně chránit hostitele před kolonizací patogenními mikroorganismy (Huang et al. 2020). Různí hostitelé si v procesu adaptace na prostředí vytvořili vlastní střevní mikrobiom, aby se přizpůsobili okolnímu prostředí (Cao et al. 2022).

Střevní mikrobiota prasat zahrnuje rozmanité a komplexní společenstvo bakterií, ve kterém dominují anaerobní grampozitivní bakterie. Svým vlivem na fyziologické, vývojové, nutriční a imunologické procesy mikrobiota výrazně ovlivňuje zdravotní stav a užitkovost zvířete (Petersson et al. 2009). Komenzální a patogenní bakterie spolu běžně koexistují po většinu reprodukčního života prasete, a to i v případě absence zjevného onemocnění (Pluske et al. 2018).

Pestrá populace bakterií se liší v hustotě a diverzitě v různých kompartmentech GIT a v různých fázích života prasete (Pluske et al. 2018). Mikroorganismy začínají kolonizovat sterilní střevo novorozeného prasete hned po narození. Plně vyvinutá mikrobiota se ve střevě vytvoří během několika týdnů po narození (Liao & Nyachoti 2017). Časná střevní kolonizace je rozhodující pro morfologický i imunologický vývoj GIT prasete. Během růstu se mikrobiom mění a vykazuje zvýšenou diverzitu, která je důležitým ukazatelem zdraví GIT. Po ustálení nakonec mikrobiota dosáhne vyrovnaného složení komunity (Correa-Fiz et al. 2019). Pokud je soužití vyvážené, střevo prasete bude zdravé a bude dobře fungovat (Liao & Nyachoti 2017).

Střevní mikrobiota přispívá také k neurofyziologické regulaci, která následně řídí neurotransmisi, kognici a životní pohodu. Toho je dosahováno prostřednictvím regulace imunitního a endokrinního systému prostřednictvím uvolňování bakteriálních metabolitů. Osa mozek-střevo-mikrobiom nebyla dosud u prasat důkladně zkoumána. Avšak na základě analýzy tohoto systému u jiných druhů savců je pravděpodobné, že tato osa bude hrát klíčovou roli i u prasat. Mikrobiota a její metabolity jsou spojené s modulací chování

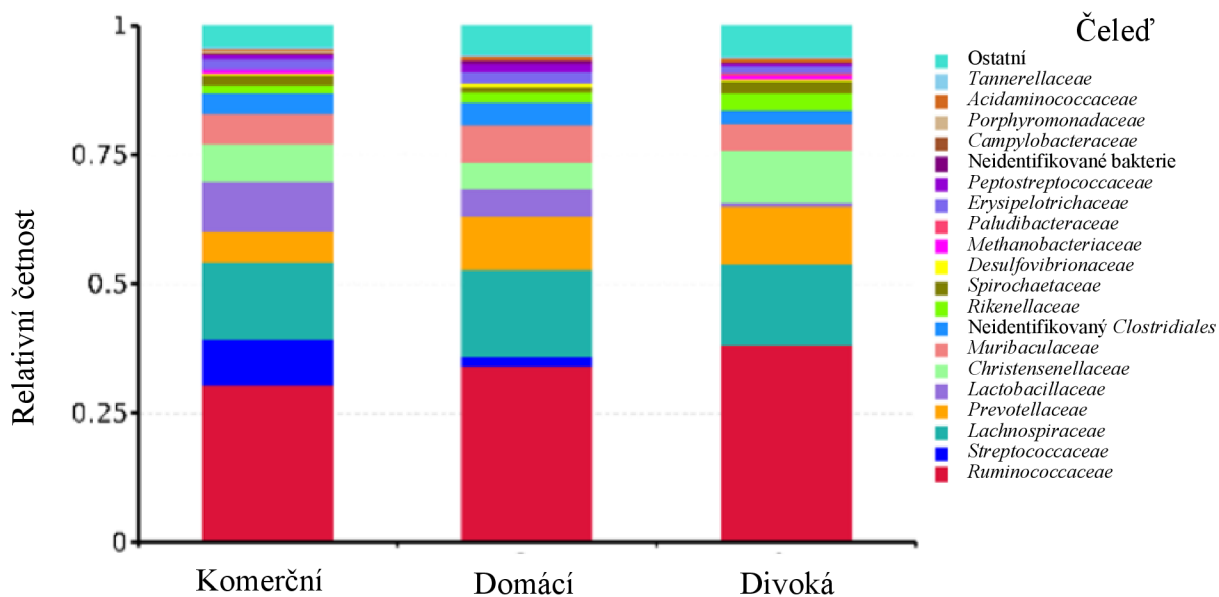


a procesem mozku, včetně jeho biochemie, emocí, reakcí na stres a bolest a fungování GIT (Patil et al. 2020).

Domestikací hostitele se změnila funkce střevní mikrobioty. Divoká prasata vykazují zvýšený podíl mikrobiálních genů zapojených do adaptace na prostředí, imunitního systému, degradace a biosyntézy mastných kyselin a enzymů degradujících celulózu a hemicelulózu. U domácích prasat převyšuje podíl drah spojených s degradací škrobu, enzymů podílejících se na syntéze či rozkladu polysacharidů a drah některých aminokyselin souvisejících s růstem a reprodukční výkonností. Kromě toho se u domácích prasat významně zvýšila diverzita genů antibiotické rezistence a genů antimikrobiální rezistence (Wei et al. 2022).

Strukturální rozmanitost střevního mikrobiomu divokých prasat zkoumali Yang et al. (2020). Zjistili, že u divokých i domácích prasat dominoval kmen Firmicutes. Ve střevech divokých prasat byl však druhou nejdominantnější skupinou bakterií kmen Actinobacteria. Chen et al. (2021a) pozorovali vyšší diverzitu střevního mikrobiomu u divokých prasat ve srovnání s komerčními prasaty plemene Duroc. Střevní mikrobiom divokých prasat měl výrazně vyšší zastoupení *Bacteroides* spp. Ve střevním mikrobiomu divokých prasat byly také významně zastoupeny bakterie rodu *Bifidobacterium*. U prasat plemene Duroc převažovaly druhy bakterií z rodu *Prevotella*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*.

Huang et al. (2020) porovnávali fekální vzorky 3 skupin prasat: divokých, domácích a pro komerční účely z chovných farem (Duroc, Landrace, Yorkshire). Ve všech vzorcích trusu bylo nalezeno patnáct bakteriálních kmenů, přičemž u všech převažovaly Firmicutes, Bacteroidetes a Spirochaetota. Výrazné rozdíly ve složení střevní mikrobioty se poté vyskytovaly hlavně na úrovni čeledí a rodů. Skupina divokých prasat vykazovala vyšší podíl čeledí *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae* a *Christensenellaceae*. Jednotlivé čeledi u komerčních, domácích a divokých prasat a jejich četnost představuje **Obrázek 3**. Přičemž čeledi *Ruminococcaceae* a *Prevotellaceae* mohou u divokých prasat souviset s rozkladem celulózy a produkcí protizánětlivých látek (Lamendella et al. 2011; Hayashi et al. 2007). Čeď *Christensenellaceae* by mohla mít zase spojitost se snížením pravděpodobnosti vzniku obezity u savců (Stenman et al. 2015). Díky tomu mohou mít divoká prasata vysoký podíl libového masa s nižším obsahem tuku (Zhang et al. 2015). U komerčních a domácích prasat převyšovaly bakterie rodu *Streptococcus* a *Lactobacillus*, kdy ve skupině domácích prasat byla pozoruhodně vysoká relativní četnost druhu *Lactobacillus amylovorus*. Tu lze vysvětlit vysokým obsahem škrobu ve stravě domácích prasat (Huang et al. 2020).



Obrázek 3: Relativní četnost bakterií u skupin domácích, komerčních a divokých prasat na úrovni čeledi, upraveno dle Huang et al. (2020)

Wylensek et al. (2020) vytvořili veřejně dostupnou sbírku komenzálních kmenů bakterií ze střeva prasat (PiBAC). Všechny kmeny byly uloženy v Německé sbírce mikroorganismů a buněčných kultur (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; DSMZ). Sbíрка PiBAC zahrnuje 110 druhů bakterií ze 40 čeledí a 9 kmenů. Jednotlivé kmeny bakterií s DSM číslem izolované z prasat uvádí **Tabulka 1**. Tento seznam obsahuje také 31 dalších kmenů získaných ze střeva prasat již dříve jinými subjekty, které jsou taktéž dostupné v DSMZ sbírce. Zároveň odhalili, že třicet druhů z této sbírky vykazovalo zvýšený výskyt i relativní četnost ve střevě prasat ve srovnání s myši a lidmi, což naznačuje jejich hostitelskou specifitu.

Tabulka 1: Seznam dostupných kmenů bakterií izolovaných ze střeva prasat v DSMZ sbírce

Kmen (DSM číslo)	
<i>Acetivibrio ethanolgignens</i> (3005)	<i>Fusobacterium mortiferum</i> (108838)
<i>Acidaminococcus fermentans</i> (105754, 20731)	<i>Fusobacterium perfoetens</i> (105865)
<i>Aeriscardovia aeriphila</i> (22365)	<i>Hallerella porci</i> (104699)
<i>Alistipes shahii</i> (107272)	<i>Hallerella succinigenes</i> (104698)
<i>Anaerobutyricum soehngeni</i> (109238)	<i>Holdemanella porci</i> (105256)
<i>Anaerococcus porci</i> (101005)	<i>Hornefia butyriciproducens</i> (104962)
<i>Anaerosalibacter bizertensis</i> (106491)	<i>Hornefia porci</i> (104948)
<i>Anaerovibrio slackiae</i> (108025)	<i>Inconstantimicrobium porci</i> (108839)
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> (105329)	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i> (104946)
<i>Arcobacter trophiarum</i> (25469)	<i>Lacrimispora celerecrescens</i> (105336)
<i>Arthrobacter</i> sp. (105845)	<i>Lactobacillus amylovorus</i> (107288)

<i>Bacillus altitudinis</i> (108493)	<i>Lactobacillus equicursoris</i> (104994)
<i>Bacillus oryzicola</i> (100955)	<i>Lactobacillus johnsonii</i> (106897)
<i>Bacteroides coprosuis</i> (18011)	<i>Lactobacillus porci</i> (105804)
<i>Bacteroides eggerthii</i> (107245)	<i>Ligilactobacillus agilis</i> (102821)
<i>Bacteroides fragilis</i> (103087)	<i>Ligilactobacillus ruminis</i> (107447)
<i>Bacteroides pyogenes</i> (20611)	<i>Ligilactobacillus saerimneri</i> (16049)
<i>Baileyella intestinalis</i> (106896)	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> (103789, 105842)
<i>Berryella intestinalis</i> (104960)	<i>Limosilactobacillus mucosae</i> (102820, 13345)
<i>Bifidobacterium apri</i> (100238)	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> (108836)
<i>Bifidobacterium boum</i> (102857)	<i>Megasphaera elsdenii</i> (106891, 100961)
<i>Bifidobacterium choerinum</i> (20434)	<i>Megasphaera hexanoica</i> (106893)
<i>Bifidobacterium longum subsp. suillum</i> (28597)	<i>Micrococcus luteus</i> (105846)
<i>Bifidobacterium longum subsp. suis</i> (20211)	<i>Mobiluncus porci</i> (108840)
<i>Bifidobacterium porcinum</i> (17755)	<i>Mogibacterium kristiansenii</i> (106282)
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> (20099)	<i>Oliverpabstia intestinalis</i> (106162)
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> (22366)	<i>Olsenella porci</i> (105246)
<i>Bifidobacterium sp.</i> (107246)	<i>Parabacteroides distasonis</i> (106899)
<i>Bifidobacterium thermophilum</i> (102827, 20210)	<i>Paraclostridium sp.</i> (107287)
<i>Bifidobacterium tsurumiense</i> (104387)	<i>Parafammyhessea umbonata</i> (105334, 22620, 105184)
<i>Bilifactor porci</i> (106898)	<i>Peptoniphilus porci</i> (104947)
<i>Bullifex porci</i> (105750)	<i>Peptostreptococcus porci</i> (106284)
<i>Butyricoccus porcorum</i> (104997)	<i>Phocaeicola vulgatus</i> (107446)
<i>Campylobacter coli</i> (4689)	<i>Porcincola intestinalis</i> (106895)
<i>Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i> (19053)	<i>Prevotella copri</i> (108494)
<i>Cellulosimicrobium sp.</i> (105328)	<i>Prevotella sp.</i> (108495)
<i>Cloacibacillus porcorum</i> (105753, 25858)	<i>Pseudoramibacter porci</i> (106894)
<i>Clostridium beijerinckii</i> (105335)	<i>Pseudoscardovia radai</i> (24742)
<i>Clostridium butyricum</i> (10702)	<i>Pseudoscardovia suis</i> (24744)
<i>Clostridium cadaveris</i> (100963)	<i>Psychrobacillus sp.</i> (106035)
<i>Clostridium cochlearium</i> (107247)	<i>Pyramidobacter porci</i> (105193)
<i>Clostridium herbivorans</i> (14428)	<i>Rhodococcus coprophilus</i> (105337, 106145)
<i>Clostridium innocuum</i> (100998)	<i>Roseburia porci</i> (107448)
<i>Clostridium perfringens</i> (106278)	<i>Ruthenibacterium lactatiformans</i> (105274)
<i>Clostridium porci</i> (100959)	<i>Scrofimicrobium canadense</i> (105338)
<i>Clostridium scindens</i> (100975)	<i>Selenomonas bovis</i> (100960)
<i>Clostridium sp.</i> (107452)	<i>Selenomonas montiformis</i> (106892)
<i>Collinsella aerofaciens</i> (108492, 108837)	<i>Sharpea porci</i> (108165)
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> (104746)	<i>Schaalia hyovaginalis</i> (106277)
<i>Corynebacterium stationis</i> (107248)	<i>Sodaliphilus pleomorphus</i> (108610)
<i>Corynebacterium xerosis</i> (107249)	<i>Staphylococcus cohnii</i> (107449)
<i>Cutibacterium porci</i> (101006)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (106280)
<i>Desulfovibrio piger</i> (106036)	<i>Staphylococcus hominis</i> (104142)

<i>Desulfovibrio porci</i> (105247)	<i>Stecheria intestinalis</i> (109718)
<i>Dorea formicigenerans</i> (105840)	<i>Streptococcus alactolyticus</i> (100950, 20728)
<i>Eisenbergiella porci</i> (101007)	<i>Streptococcus hyointestinalis</i> (20770)
<i>Enterobacter asburiae</i> (105330)	<i>Streptococcus sp.</i> (105354)
<i>Enterococcus cecorum</i> (100908)	<i>Streptococcus thoralensis</i> (12221)
<i>Enterococcus faecalis</i> (100906)	<i>Suipraeoptans intestinalis</i> (104945)
<i>Enterococcus faecium</i> (100905, 105332, 100907)	<i>Tissierella pigra</i> (105185)
<i>Enterococcus gallinarum</i> (104116)	<i>Tractidigestivibacter scatoligenes</i> (28304)
<i>Enterococcus hirae</i> (100949)	<i>Treponema succinifaciens</i> (2489)
<i>Escherichia coli</i> (106279)	<i>Veillonella magna</i> (19857)
<i>Eubacterium callanderi</i> (100997)	<i>Velocimicrobium porci</i> (107250)
<i>Faecalicoccus pleomorphus</i> (103368)	<i>Victivallis lenta</i> (107290)
<i>Fibrobacter intestinalis</i> (104696)	<i>Victivallis vadensis</i> (107450)
<i>Floccifex porci</i> (104670)	<i>Waltera intestinalis</i> (108985)

Udržování zdravého mikrobiomu je považováno za hlavní faktor zdraví zvířat (Correa-Fiz et al. 2019). Střevní mikrobiotu lze modulovat změnou stravovacích návyků, úpravou složek stravy (tuků, bílkovin a sacharidů) či zaváděním probiotik a prebiotik (Huang et al. 2020). Pro chovatele prasat tímto může dojít k návratu investic v chovu (Liao & Nyachoti 2017).

### 3.3.3 Bifidobakterie ve střevě prasat

Prasata jsou běžně osídlena různými druhy bifidobakterií (Splíchalová et al. 2020). U divokých prasat jsou bifidobakterie zastoupeny hojněji, zatímco u domácích prasat převažují laktobacily (Wei et al. 2022). Předpokládá se, že převahu laktobacilů u domácích prasat mohly vyvolat domestikace a moderní systém krmení (Tsuchida et al. 2017). Pechar et al. (2017a) dodávají, že i samotné společenství bifidobakterií se u divokých a domácích prasat o něco liší. Důvodem rozdílů mezi oběma skupinami prasat může být genetická evoluce organismu a moderní umělý chov, uvádí Wei et al. (2022).

Počet bifidobakterií ve střevech domácích prasat se pohybuje pouze v rozmezí  $10^6$ – $10^8$  buněk na gram tráveniny. Představují tak jednu z minoritněji zastoupených složek střevní mikrobioty. Avšak jejich druhová diverzita je značně vysoká (Pechar et al. 2017a). Úzký kontakt s člověkem postupně formoval populaci bifidobakterií. Nárůst druhové diverzity mohl být důsledkem dlouhodobého soužití s člověkem, jenž je charakterizován vysokou biodiverzitou bifidobakterií (Milani et al. 2017). Trávicí trakt domestikovaných prasat vykazuje spolu s lidmi a primáty nejvyšší diverzitu bifidobakterií (Bunesova et al. 2014). Hostitelsky specifické druhy nacházející se u prasat domácích jsou *B. choerinum* (Scardovi et al. 1979), *B. longum* subsp. *suis* (Matteuzzi et al. 1971), *B. longum* subsp. *suillum* (Yanokura et al. 2015), *B. psychraerophilum* (Simpson et al. 2004b) či *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* (Zhu et al. 2003). Z domácích prasat byly izolovány také druhy *B. boum* (Scardovi et al. 1979), *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* (Mitsuoka 1969), *B. pseudolongum*

subsp. *globosum* (Scardovi et al. 1969) a *B. thermophilum* (Mitsuoka 1969), uvádí ve své knize Biavati & Mattarelli (2006).

Různé druhy hospodářských zvířat žijí často vedle sebe na malém prostoru. To může vést k orálnímu přenosu původně hostitelsky specifických bakteriálních taxonů (Pechar et al. 2017b). U domácích prasat z rakouských farem Gavini et al. (2006) zjistili nejvyšší početnost druhu *B. thermophilum* následovaný druhy *B. pseudolongum* a *B. animalis*. Druh *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* převažoval ve výkalech prasat, zatímco *B. pseudolongum* subsp. *globosum* převažoval ve výkalech jiných druhů zvířat. Také odhalili u některých izolátů ze skotu, prasat, králíků, koz a koní příslušnost k bifidobakteriálním druhům převážně lidského původu: *B. adolescentis*, *B. bifidum* a *B. catenulatum*. Paliy et al. (2020) analyzovali kultury bakterií izolované z kravského mléka, trávicího traktu skotu a selat různých věkových skupin. Ze všech izolátů představoval podíl rodu *Bifidobacterium* 33,14 %. Významné rozdíly byly zjištěny u druhového složení bifidobakterií izolovaných z prasat různého stáří. Pouze selata ve věku 1–15 dnů se vyznačovala přítomností *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *suis* (76,92 % z celkového počtu zjištěných bifidobakterií). U prasat ve stáří 30–120 dnů byly izolovány druhy *B. animalis* subsp. *lactis* a *B. longum* subsp. *longum* (60,0 % z celkového počtu zjištěných bifidobakterií). *B. adolescentis* bylo běžným druhem nalezeným u selat obou věkových skupin. Maxwell et al. (2004) zase u selat z komerčního chovu izolovali druhy *B. boum* a *B. choerinum*. Mikkelsen et al. (2003) identifikovali *B. boum* jako převládající druh bifidobakterií u mléko sajících selat. Příčemž Killer et al. (2013) odhalili, že *B. boum* se nachází také v trávicím traktu divokých prasat.

Ve většině fekálních vzorků divokých prasat byly nejhojnějšími rody bakterií *Bifidobacterium* spp. a *Allobaculum* spp., popisuje Yang et al. (2020). To odpovídá v rozmezí 2,08–34,87 % z celkového zastoupení kultivovaných bakterií v testovaných vzorcích. Relativní četnost bifidobakterií se mezi různými oblastmi střeva podstatně lišila. Významně vyšší množství bylo ve dvanáctníku a lačniku oproti kyčelníku, slepému střevu a tlustému střevu. Chen et al. (2021a) ve své studii uvedli za významně zastoupené druhy bifidobakterií u divokých prasat *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum*, *B. bifidum* a *B. pseudolongum*. Pechar et al. (2017b) dokonce izolovali a popsali nový druh bifidobakterie s názvem *B. apri* z divokých prasat ze Středočeského kraje v České republice. Nejpočetnější skupinu bifidobakterií osídlujících tlusté střevo divokých prasat představoval dle Pechara et al. (2017a) necharakterizovaný druh patřící do skupiny termofilních bifidobakterií. Významně zastoupeny byly také druhy *B. thermophilum* a *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum*.

### 3.3.4 Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty prasat

Mikrobiota hospodářských zvířat může být významně ovlivněna faktory, které se dále mohou v různých zemích a regionech lišit. Kromě toho může odrážet také velkou variabilitu druhů a genotypů či biologických funkcí v různých vývojových stádiích (Ikeda-Ohtsubo et al. 2018). Při utváření střevní mikrobioty prasete hraje důležitou roli mnoho faktorů (Worobey 2010). Rozmanitost a aktivitu mikrobioty ovlivňuje mimo kolonizaci mikrobiálních společenstev také stáří prasete a prostředí, ve kterém žije. Dále mezi tyto faktory spadá

například složení a zpracování krmiva, přítomnost antimikrobiálních a doplňkových látek, způsoby krmení a dostupnost výživy, výskyt onemocnění, odstav selat, roční období, stres či genetika (Pluske et al. 2018). A právě kvůli těmto odlišnostem mezi prasaty pravděpodobně existují významné rozdíly ve složení mikrobiomu na úrovni rodu (Yang et al. 2020). S mnoha změnami ovlivňující střevní mikrobiotu se setkávají domestikovaná zvířata stejně jako industriální společnost (Reese et al. 2021).

#### 3.3.4.1 Strava

Strava je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují složení a diverzitu střevní mikrobioty (Huang et al. 2020). Komplexnost zdrojů potravy může být jedním z faktorů, které vedou k rozmanitějšímu a bohatšímu mikrobiomu (Cao et al. 2022). Mikrobiota GIT se utváří s tím, jak se strava stává složitější (Correa-Fiz et al. 2019).

Krmné dávky prasat domácích se skládají převážně z obilných zrn s preferencí pšeničného zrna. Produkty z pšenice jsou jedny z nejbohatších přírodních zdrojů fruktanů. Další významnou složkou potravy prasat jsou sójové produkty. Obsahují galaktooligosacharidy, u nichž bylo prokázáno, že mají u prasat prebiotické účinky (Loh et al. 2006). Domácí prasata jsou obecně více závislá na obilném škrobu (Tsuchida et al. 2017). Oproti tomu divoká prasata konzumují více rozmanitou stravu. Přibližně 70 % jejich potravy tvoří rostlinná složka a 30 % živočišná (Pecka-Kiełb et al. 2016). Většinu přijímané potravy představují kořeny, rostliny a zemědělské plodiny (Huang et al. 2020). Mezi oblíbené složky potravy divokých prasat patří kukuřice, bukové ořechy, lesní plody, ale také tráva, byliny či výhonky stromů a keřů (Pecka-Kiełb et al. 2016). Celulóza a xylan jako součást rostlinných sacharidů nadzemní části rostlin tvoří asi 70 % rostlinné hmoty konzumované divokými prasaty. Pravděpodobně proto se jejich mikrobiota adaptovala na stravu bohatou na vlákninu (Tsuchida et al. 2017). Potravu živočišného původu tvoří převážně vejce a mláďata hnízdících ptáků, žáby nebo mláďata savců. Živí se také mršinami, které se nacházejí na jejich území (Pecka-Kiełb et al. 2016).

U izolátů z divokých prasat byly nalezeny geny pro glukosidázy a geny pro metabolismus nukleových kyselin a bází, jako je cytosin deamináza, xantin a další permeázy. To naznačuje, že pro přežití střevních bakterií v prostředí střeva s omezeným obsahem bílkovin je nezbytná schopnost vychytávat dusík. To může odrážet stav potravy divokých prasat s omezeným obsahem bílkovin, který se běžně vyskytuje v zimním období. Tyto specifické profily v metabolismu sacharidů bakteriálních izolátů divokých prasat sdílel typový kmen *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* a nikoliv kmen *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* odvozený od domácích prasat. To nasvědčuje adaptaci *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* na stravovací návyky hostitele (Tsuchida et al. 2017).

Hlavním úkolem chovu prasat pro produkci vepřového masa je krmení. Náklady na krmivo představují více než dvě třetiny celkových provozních nákladů v chovu prasat. Zlepšení metabolického využití živin z krmiva zvýší zisk a zároveň sníží dopad produkce prasat na životní prostředí. Mezi mechanismy mikroorganismů, které mají potenciální význam pro účinnost krmiva, patří pozitivní zpětná vazba mezi nimi a produkcí mucinu či kyseliny máselné (McCormack et al. 2017). Zvyšování konverze krmiva závisí do značné míry na

zdravém GIT. Pouze zdravé střevo může vést k lepšímu trávení krmiva a lepšímu vstřebávání živin prostřednictvím jeho epitelálních buněk (Liao & Nyachoti 2017).

Obohacení specifickými mikroby s prospěšnou funkcí by mohlo určit perspektivní mikrobiální biomarkery pro účinnost krmiva v rámci střevní mikrobioty prasat. Optimalizace mikrobioty by mohla být potenciálně dosažena pomocí specifických bakteriálních taxonů jako probiotik nebo zvýšením jejich množství pomocí prebiotik či jiných doplňků stravy (McCormack et al. 2017).

#### **3.3.4.1.1 Probiotikum**

Slovo probiotikum bylo odvozeno z řečtiny a znamená „pro život“ nebo „ve prospěch života“. V průběhu let mělo několik různých definic (Liao & Nyachoti 2017). Celosvětově nejrozšířenější a nejpřijímanější byla definice FAO/WHO z roku 2001: „živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos“. Pro vyjasnění nesrovnalostí a zohlednění pokroku ve vědě došlo v roce 2013 k drobné gramatické opravě definice: „živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos“ (Hill et al. 2014). Komerční produkty mohou obsahovat bakteriální kultury, kvasinky nebo obojí (Liao & Nyachoti 2017).

Krmná antibiotika byla dříve používána v subterapeutickém dávkování ke zvýšení růstové výkonnosti zvířat, k ochraně proti onemocnění a tím ke zlepšení ekonomiky živočišné výroby (Petersson et al. 2009). Používání antibiotik v chovech bylo stále více zpochybňováno kvůli potenciálnímu riziku, které mohou představovat pro lidské zdraví v souvislosti s rostoucí mikrobiální rezistencí vůči antibiotikům. Tato hrozba vedla k velkému tlaku na snížení jejich používání (Barba-Vidal et al. 2019). Používání subterapeutických antibiotik v krmivu se proto kvůli jejich vlivu na účinnost humánních léčiv roku 2006 v Evropské unii zakázalo. To podnítilo hledání alternativ k zajištění zdraví zvířat a podpoře růstu (Petersson et al. 2009). Vzhledem k této legislativě a vysoké poptávce spotřebitelů po bezpečném vepřovém mase je zařazení alternativních krmných doplňků do krmiv prasat nutné. A to zejména pro podporu ziskového a udržitelného chovu prasat (Liao & Nyachoti 2017). Jako alternativa k antibiotikům mají probiotika za cíl zabránit průjmům u selat po odstavu, zlepšit účinnost krmiva, podpořit růst, snížit zápach a v konečném důsledku poskytnout prasatům zdravotní výhody (Vondruskova et al. 2009). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) zveřejnily společné sdělení týkající se snížení používání antimikrobiálních látek u zvířat určených k produkci potravin. Sdělení vyzývá k přehodnocení systémů živočišné výroby a k nahrazení antibiotik v současnosti existujícími alternativami, mezi něž patří i probiotika (Barba-Vidal et al. 2019). Proto existuje značný potenciál využití probiotik jako náhrady antibiotik, které se v současné době stále používají v mnoha částech světa (Liao & Nyachoti 2017).

Pro zvýšení efektivity produkce uplatňuje moderní prasečí průmysl některé pokročilé, ale nepřirozené chovatelské postupy. Tyto kroky mohou u prasat vyvolat určitý stres, způsobit změny ve složení střevní mikrobioty, a tím ohrozit odolnost prasat vůči patogenům (Liao & Nyachoti 2017). Intenzivní chov zahrnující fyziologické a psychologické stresory může vytvořit dysfunkci střevní bariéry (Barba-Vidal et al. 2019).

V 70. letech 20. století se probiotika začala přidávat do krmiv pro zvířata s cílem zvýšit jejich růstovou výkonnost, zdravotní stav a odolnost vůči nemocem. V 80. letech 20. století se koncept probiotik stával osvědčeným řešením pro zlepšení střevního zdraví zvířat a produkční výkonnosti (Liao & Nyachoti 2017). Probiotika byla navržena jako alternativa s největším potenciálem pro hospodářská zvířata (Chang et al. 2018). V posledních několika letech výzkum v oblasti probiotik značně vzrostl. Průmysl s chovem prasat z něj může díky jednotnému přístupu ke zdraví a podobnostem mezi lidmi a prasaty značně těžit (Barba-Vidal et al. 2019).

Probiotika se mohou využívat ve všech fázích chovu prasat: u prasnic, selat i u prasat ve výkrmu. Cíl použití probiotik je však v každé situaci odlišný. Suplementace probiotik u prasnic může zvýšit spotřebu krmiva a zlepšit tak jejich tělesnou kondici na konci kojení. První dva týdny života selat je jejich mikrobiální dynamika méně stabilní a náchylnější k narušení (Barba-Vidal et al. 2019). Bylo prokázáno, že bakteriální komunita ve střevě selat suplementující probiotika může být značně modifikována. Došlo k významnému snížení výskytu průjmů po odstavu. Vzhledem k ekonomickému významu je snížení průjmů po odstavu jedním z hlavních cílů suplementace probiotik u selat (Taras et al. 2007). Kromě přímého zvýšení zdraví a produktivity prasnic a selat je v současné době předmětem vědeckého zájmu posouzení schopnosti prasnic dodávat probiotika selatům v raných fázích života. Ve výkalech a trávicím traktu selat byly nalezeny probiotické bakterie podávané prasnicím, aniž by byly podávány selatům. To naznačuje druhou cestu příjmu vedle diety (Barba-Vidal et al. 2019). Probiotické bakterie se přenášejí z prasnice na sající selata pravděpodobně kontaktem s výkaly matky (Taras et al. 2007). Z praktického hlediska by tedy podávání probiotik prasnicím mohlo podpořit zdravotní přínosy selat a vytvořit tak robustní mikrobiotu odolnou vůči nepříznivým ekologickým vlivům (Barba-Vidal et al. 2019).

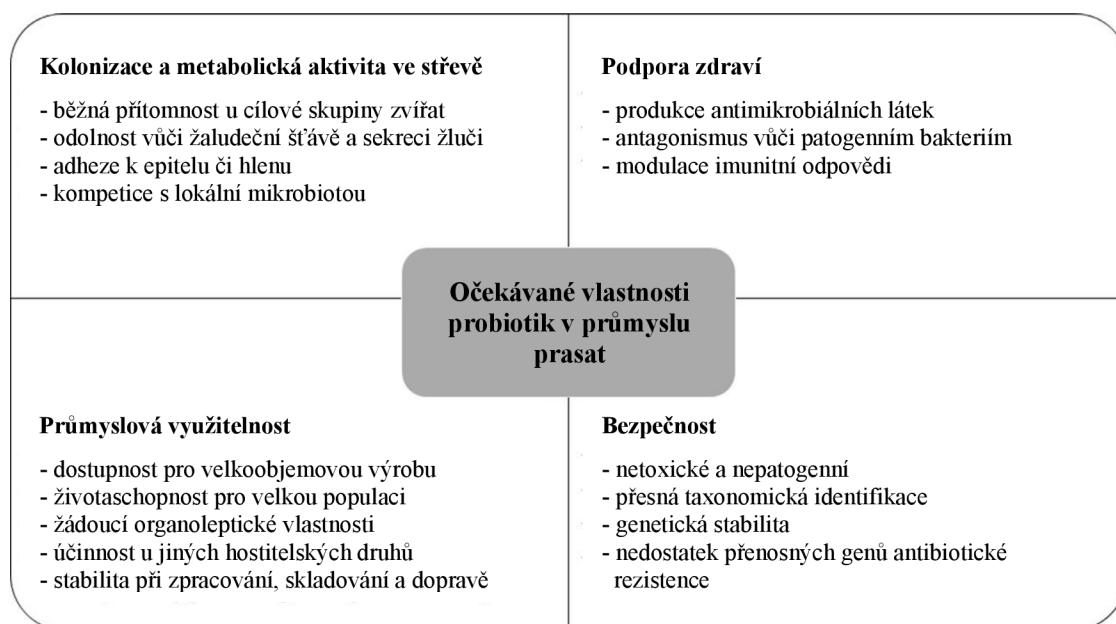
Ačkoli starší prasata mají rozvinutější imunitu a schopnost odolávat střevním onemocněním, stále existuje prostor pro působení probiotik. A to zejména v raných fázích růstu nebo při dietě s vysokou energetickou denzitou (Barba-Vidal et al. 2019). Probiotika se také podávají zvířatům, která byla terapeuticky léčena antibiotiky či jinými léky (Liao & Nyachoti 2017). Další využití mohou mít zejména v podmínkách s nízkou hygienou, kde mohou být zvířata ohrožena subklinickými chorobami. Užitečnost probiotik se posuzuje také pro snižování znečišťujících látek ze zvířecího trusu v životním prostředí. Některá probiotika jsou schopna snižovat obsah škodlivého plynu ve výkalech ( $H_2S$ ) nebo amoniaku z hnoje (Barba-Vidal et al. 2019).

Probiotika mohou obecně zlepšit produkční parametry rostoucích prasat a zároveň i snížit ekologickou stopu produkce prasat (Barba-Vidal et al. 2019). Probiotický efekt bifidobakterií u prasat byl studován především v souvislosti s imunoregulací, zlepšenou konverzí krmiva a sníženou mortalitou (Pechar et al. 2017b). Některé kmeny bifidobakterií jsou „obecně uznávány jako bezpečné“. To podpořilo využití bifidobakterií jako probiotických agens (Sharma et al. 2021).



○ Probiotické doplňky stravy pro chov prasat

Aby mohly být probiotické bakterie využívány v chovu prasat, musí mít několik vlastností. Tyto atributy lze rozdělit do čtyř hlavních skupin (**Obrázek 4**). Schopnost kolonizovat střevo hostitele znamená, že bakterie musí odolávat žaludeční kyselině a samotnému trávení, aby mohly interagovat se střevem hostitele. Podpora zdraví probíhá buď přímou stimulací imunologické reakce hostitele, nebo nepřímo snížením patogenů. Nezbytná je i průmyslová využitelnost a bezpečnost probiotik (Barba-Vidal et al. 2019).



Obrázek 4: Potřebné vlastnosti probiotik, upraveno dle Barba-Vidal et al. (2019)

Existuje široká škála mikroorganismů, které byly studovány jako probiotika. To vede k četným komerčním produktům, které jsou propagovány a uváděny na trh. A to buď jako potravinové doplňky pro lidi nebo krmné přísady pro hospodářská zvířata. Komerční kmeny probiotických druhů by měla být izolována ze střevní mikrobioty uživatelů, kterým jsou probiotika určeny (Liao & Nyachoti 2017). Jsou obecně specifická pro hostitelský druh a předpokládá se, že jsou účinnější ve svém přirozeném prostředí (Chang et al. 2018). Mezi jednotlivými komerčními produkty existují nápadné rozdíly, které jsou dány původem, vlastnostmi a způsoby působení různých mikroorganismů (Liao & Nyachoti 2017).

Nejčastěji se používají bakterie rodu *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Mezi bifidobakterie využívající se běžně v krmivech pro zvířata patří *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. bifidum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum* a *B. thermophilum* (Liao & Nyachoti 2017).

Kolonizaci probiotickými bakteriemi ovlivňuje spíše specifčnost kmene než hostitele. U daného kmene mohou být rozdíly v míře kolonizace a perzistence. A to důsledkem doby intervence, rozdílů v podané dávce či použitých detekčních metod. Proto je třeba pro každý kmen a produkt definovat adekvátní množství pro vhodnou individuální terapii. Dva různé kmeny bifidobakterií s podobnou schopností implementace neovlivňují růstovou výkonnost

selat stejným způsobem. Rozdíly v účincích jednotlivých kmenů zdůrazňují výhodu použití kombinací probiotik jako synergické směsi (Modesto et al. 2009). Proto většina komerčních výrobků obsahuje více než jeden druh či kmen. Jiné dokonce obsahují i životaschopné kvasinky (rody *Candida*, *Saccharomyces*) nebo houby (rod *Aspergillus*: *A. oryzae*, *A. niger*) (Liao & Nyachoti 2017).

U prasat se kombinace probiotik ukázaly jako úspěšné, pokud byly použity jako doplněk stravy i jako součást krmiva (Barba-Vidal et al. 2019). Probiotika zařazována do krmiva se dodávají v množství  $10^6$ – $10^7$  KTJ na gram krmiva (Modesto et al. 2009). U zkrmování probiotik velmi závisí na použitých produktech a chovatelských postupech (Liao & Nyachoti 2017).

Z kravského bachoru, kuřecího střeva a prasečích výkalů byly vybrány 4 kmeny s nejvyšší antipatogenní aktivitou proti enteropatogenní *E. coli* vyskytující se často u domácích prasat. Metodou sekvenování genu pro 16S rRNA byly identifikovány jako *B. boum* a *B. thermophilum*. Zejména *B. thermophilum* izolované z prasete vykazovalo nejlepší vlastnosti. A to vysokou antipatogenní aktivitu, odolnost vůči kyselinám a žluči a adhezní schopnost. Proto byl tento druh navržen jako vhodné a nejslibnější probiotikum, které inhibuje střevní patogeny u prasat (Lee et al. 2014). Kloze et al. (2010) potvrzuje, že *B. thermophilum* může mít silný potenciál pro snížení patogenů u prasat. Maxwell et al. (2004) zase navrhli za slibné probiotikum *B. choerinum*, které může být obzvláště dobře přizpůsobeno střevům selat před odstavem.

Někteří chovatelé prasat a dalších hospodářských zvířat probiotické produkty již používají. Příklady několika komerčních probiotik dostupných běžně na trhu obsahuje **Tabulka 2** (Bogere et al. 2019). Přičemž Markowiak-Kopeć & Slizewska (2018) uvádí probiotické přípravky určené přímo pro prasata: Biogen N (Bio-Gen) s druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus faecium* a Biogen T (Bio-Gen) s druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

Tabulka 2: Příklady komerčně dostupných probiotik běžně používaných u prasat a jiných hospodářských zvířat, upraveno dle (Bogere et al. 2019)

Název probiotika	Složení	Cílový druh zvířete
World Labs®	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptomyces grieus</i>	prasata, drůbež, skot
BioPlus 2B®	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	prasata, drůbež, telata, králíci
MICROGUARD®	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus mesentericus</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Bacillus subtilis</i>	prasata a drůbež
PrimaLac®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i> <i>Enterococcus faecium</i>	prasata, skot, koně, drůbež
PORCBOOST® EB	<i>Bacillus subtilis</i>	kojená a odstavená selata
Protexin®	<i>L. debrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	většina hospodářských zvířat včetně prasat
ENVIVA MPI®	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus farciminis</i>	prasata
<i>B. infantis</i> IM1®	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	prasata a lidi

Zájem o probiotika v krmivech a poptávka po nich neustále roste po celém světě (Barba-Vidal et al. 2019). Je však zapotřebí přesněji vymezený výzkum pro vývoj lepších probiotických produktů. A to především jako alternativa antibiotických stimulatorů růstu pro světový průmysl prasat. Důležitá je rovněž širší osvěta o používání těchto produktů (Liao & Nyachoti 2017).

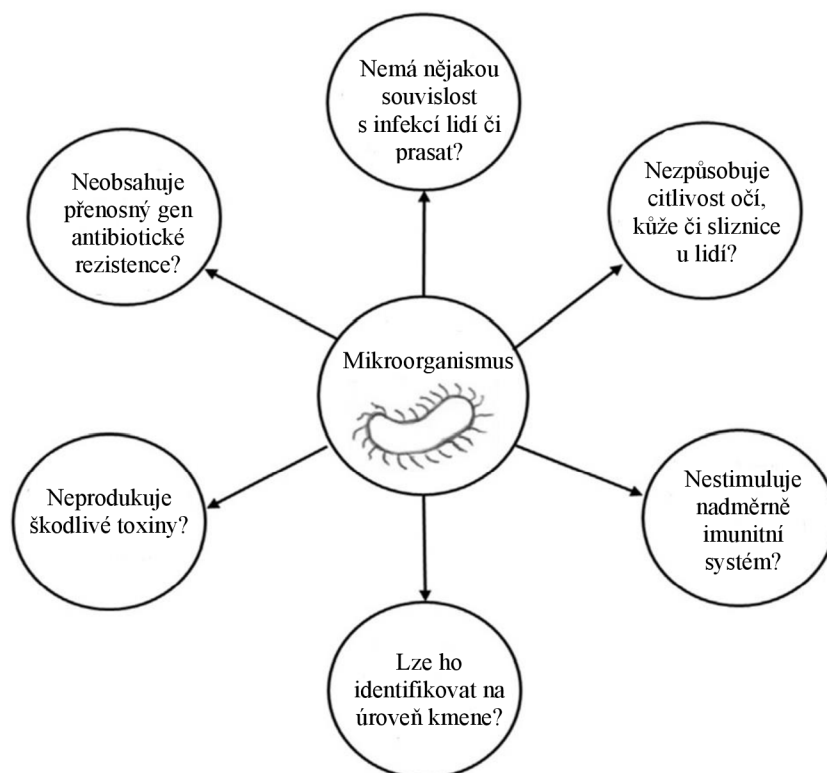
- Vliv probiotik na kvalitu masa

Dalším cílem probiotik by mohlo být zlepšení konečné kvality masa (Barba-Vidal et al. 2019). Chang et al. (2018) naznačují pozitivní vliv probiotik na jatečně upravené tělo a kvalitu vepřového masa. Podávání probiotik by mohlo zlepšit profil mastných kyselin a snížit hladiny cholesterolu. Dle Barba-Vidal et al. (2019) bylo také popsáno, že probiotika ovlivňují barvu, mramorování a pevnost, čímž potenciálně zvyšují organoleptické vlastnosti masa.

Zkrmování probiotik (kvasinky, bakterie mléčného kvašení a *Bacillus subtilis*) významně zlepšilo kvalitu vepřového masa, uvádí ve své studii Chang et al. (2018). Zvýšila se vaznost a snížily se ztráty odkapem. Dále se vytvořila živější barva masa. V porovnání s kontrolní skupinou se při podávání probiotik významně snížil obsah popela, solí a pH (po 5 a 15 dnech). Podávání probiotik mělo vliv i na zvýšení polynenasycených mastných kyselin, omega mastných kyselin ( $\omega 3$  a  $\omega 6$ ) a některých aminokyselin a nukleotidů, které souvisejí s chutí a vůní. V mase se rovněž zvýšil obsah kyseliny askorbové, která působí jako dobrý antioxidant. Systémové používání probiotik tedy může vést k produkci nezávadného vepřového masa, aniž by mělo negativní vliv na jatečné znaky prasat.

- Bezpečnost a případná rizika spojená s probiotiky

Velkým problémem spojeným s konzumací probiotik je bezpečnost (Sharma et al. 2021). Všechny mikroorganismy zvažované k využití jako probiotikum ve výživě prasat by měly být posuzovány s ohledem na rizika, jež znázorňuje **Obrázek 5** (Liao & Nyachoti 2017). Vědci jsou opatrnější při hodnocení bezpečnosti nově vznikajících probiotických kmenů. A to především kvůli genům antibiotické rezistence a jejich možnosti přenosu do střevní mikrobioty (Sharma et al. 2021). Přijímají se přísná opatření, aby se používaly pouze probiotické mikroorganismy s prokázanou absencí přenosných genů antibiotické rezistence. Probiotika jsou obecně vybírána tak, aby měla dobrou adhezenci ke střevní sliznici, protože ta je považována za důležitou pro mechanismus jejich účinku. Přesto může adherence ke střevní sliznici také zvýšit translokaci a virulenci bakterií. Existují tedy obavy, že nejúčinnější probiotika mohou mít také zvýšenou patogenitu (Barba-Vidal et al. 2019). Závažné riziko probiotik v krmivech může být také z přítomnosti enterotoxinů a emetických toxinů, které probiotika nesmí produkovat (Liao & Nyachoti 2017).



Obrázek 5: Hlavní otázky při posuzování bezpečnosti probiotických bakterií v krmivu, upraveno dle Liao & Nyachoti (2017)

Používání probiotik však nepředstavuje vysoké riziko vnášení cizorodých, chemických či nebezpečných látek do potravin živočišného původu. Je proto obecně považováno za bezpečné pro prasata, lidi i životní prostředí. Aby však bylo možné probiotika efektivně využívat k podpoře celosvětové produkce prasat, je nezbytné zohlednit jak účinnost, tak bezpečnost používání probiotik (Liao & Nyachoti 2017).

#### o Nedostatky a negativa probiotik

Od prvního pozorování prospěšných bakterií následovalo okamžité komerční využití. Od té doby se využívání probiotických kmenů mnohokrát zakládalo spíše na empirických zkušenostech. To může být vedle nedostatečné charakterizace komerčních probiotických kmenů vysvětlením mnohokrát uváděných rozporupných výsledků různých probiotik při jejich použití v praxi (Barba-Vidal et al. 2019). Probiotika nejsou všelékem, ale jejich selhání nemusí nutně znamenat, že nefungují, protože jejich účinek je velmi závislý na mnoha faktorech (Modesto et al. 2009).

Probiotika jsou konzumována orálně, proto jsou vystavena nepříznivým podmínkám v horní části GIT. Vysoce kyselé žaludeční tekutiny v žaludku mohou přímo snižovat jejich životaschopnost a měnit jejich vlastnosti. Tento problém lze vyřešit pomocí zapouzdření. Probiotika jsou zachycena pomocí přírodních či syntetických polymerů jako obalových materiálů, které jsou odolné vůči žaludečním tekutinám (Sharma et al. 2021).

Analýza vlivu probiotika na střevní mikrobiální společenstva je náročným úkolem. To vyúsťuje v nedostatek podrobných znalostí o vlivu probiotik na složité interakce probíhající uvnitř střeva (Taras et al. 2007). Je obtížné zobecňovat účinky používání probiotik na produkci prasat vzhledem k rozdílům v použitých mikrobiálních kmenech, aplikovaných dávkách, délce intervence či chovatelských postupech (Liao & Nyachoti 2017). Koncept probiotik je proto v některých odvětvích považován za vědecky neprokázaný. Přestože se probiotika v chovech prasat používají již řadu let, je stále zapotřebí dalšího výzkumu. Je nutné omezit rozporuplné výsledky tradičního empirického používání probiotik, které brání jejich širokému rozšíření (Barba-Vidal et al. 2019).

#### **3.3.4.1.2 Prebiotikum**

V roce 2016 svolala Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika panel odborníků na mikrobiologii, výživu a klinický výzkum, který aktualizoval definici prebiotika. Jedná se o substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy poskytující zdravotní přínos. Tato definice rozšiřuje koncept prebiotik tak, aby případně zahrnoval i nesacharidové látky, jiná místa aplikace, než je GIT a jiné kategorie než potraviny (Gibson et al. 2017). Důležitým faktorem určujícím jakýkoli účinek prebiotik na cílové střevní bakterie může být základní složení stravy. Pokud totiž již základní strava podporuje růst bifidobakterií ve střevě, nemusela by tato populace reagovat na další přídavek substrátu (Modesto et al. 2009).

##### ○ Prebiotické doplňky stravy pro chov prasat

Definice prebiotik platí také pro zvířata, u nichž jsou strategie zaměřené na udržení zdraví a prevenci nemocí stejně důležité jako pro lidi. Prebiotika byla studována a využívána pro domácí a hospodářská zvířata i akvakulturu. Při hodnocení účinku prebiotik na zdraví zvířat je třeba vzít v úvahu přirozené rozdíly mezi jednotlivými živočišnými druhy. Tyto odlišnosti mohou být například v podmínkách prostředí, anatomii a fyziologii či ve složení stravy. Proto by měla být prokázána prebiotická účinnost, bezpečnost a vhodné dávkování pro konkrétního cílového hostitele (Gibson et al. 2017).

Použití prebiotik s bifidogenními účinky je běžnou praxí ve výživě selat při odstavu. Taková prebiotika jsou založena na fruktooligosacharidech z rostlinných zdrojů nebo galaktooligosacharidech na bázi laktózy, které se podobají galaktooligosacharidům obsaženým v mateřském mléce (Modesto et al. 2009). Prebiotika, jako jsou oligosacharidy fruktózy, manózy či chitinu, chrání selata před environmentálními stresory a zátěží patogeny (Gibson et al. 2017). V poslední době se díky nerozpustným složkám vlákniny hodnotí pšeničné otruby z hlediska jejich potenciálního prebiotického účinku u mladých prasat. Přídavek pšeničných otrub do krmiva selat může být potenciální krmnou strategií pro kontrolu průjmu po odstavu. Snižuje dobu zadržování tráveniny a omezuje množení patogenů ve střevě. Přídavek 5 % pšeničných otrub do krmiva zlepšil jeho konverzi, zvýšil koncentraci butyrátu a změnil relativní četnost mikrobiálního společenstva (Huang et al. 2020).

Pecka-Kiełb et al. (2016) taktéž uvádí zvýšení produkce SCFA ve slepém i tlustém střevě po přidavku pšeničných otrub do krmiva prasat.

Škrob s vysokým obsahem amylozy (nejméně 40 %) a nízkou stravitelností zvýšil tok tráveniny a mikrobiální fermentaci. Zároveň selektivně podporoval výskyt bifidobakterií v tlustém střevě (Regmi et al. 2011). Loh et al. (2006) uvádí, že i suplementace inulinu stabilizovala populaci bifidobakterií. Přičemž 20–50 % inulinu bylo degradováno v lačniku. Výrazný nárůst bifidobakterií v tlustém střevě zjistili Mølbak et al. (2007) u prasat krmených fruktany z čekanky (včetně fruktooligosacharidů a inulinu). Tyto fruktany mají v průměru vyšší stupeň polymerace a nižší rozpustnost. Jsou uzamčeny v matici buněčné stěny čekanky, což způsobuje, že živiny jsou hůře dostupné. Proto lze očekávat, že bakteriální fermentace fruktanů bude pomalejší, i když úplná. To má za následek, že fruktany budou v trávicím systému fermentovány distálněji.

Prebiotika nejčastěji využívaná ve výživě hospodářských zvířat jsou fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, isomaltoligosacharidy, xylooligosacharidy, inulin, laktulóza či obilná vláknina. Předávkování může vést k plynatosti a průjmu, tudíž je zásadní správné dávkování. Na druhou stranu je velkou výhodou možnost užívání dlouhodobě a preventivně bez nežádoucí účinků zaznamenaných u antibiotik. **Tabulka 3** uvádí příklady komerčních prebiotik používaných ve výživě prasat a dalších hospodářských zvířat (Markowiak-Kopeć & Slizewska 2018).

Tabulka 3: Příklady komerčně dostupných prebiotických přípravků dostupných na trhu, upraveno dle Markowiak Kopeć & Slizewska (2018)

Obchodní název produktu (výrobce)	Prebiotické složky	Cílový druh
MetSac MOS (VITTRA)	maltooligosacharidy, $\beta$ -glukany	telata, prasata, drůbež
Mycostop (Extra-vit)	maltooligosacharidy, $\beta$ -glukany	drůbež, prasata
PROFEED® (Beghin Meiji)	fruktooligosacharidy s krátkým řetězcem	koně, prasata, drůbež, telata

Ke splnění kritéria zdravotního přínosu jsou zapotřebí kontrolované studie prokazující přímou vazbu mezi prebiotikem a zdravím cílového hostitele (Gibson et al. 2017). Tzortzis et al. (2005) prokázali zvýšený počet bifidobakterií po přidavku směsi galaktooligosacharidů do krmné dávky odstavených prasat. Modesto et al. (2011) vytvořili synbiotikum obsahující *B. animalis* subsp. *lactis*, prebiotikum Actilight® zahrnující fruktooligosacharidy z cukrové řepy a dusičnany pro vyvolání antimikrobiální aktivity proti patogenům. Použití tohoto synbiotického přípravku zlepšilo přírůstky hmotnosti, účinnost krmiva a zdravotní stav odstavených selat. Rovněž se snížil počet patogenních bakterií, jako je *E. coli*.

### 3.3.4.2 Prostředí

Pro strukturu mikrobiálního společenstva je důležitým faktorem také lokalita a stanoviště. Místní flóra a fauna, fotoperioda, dostupná potrava a klimatické podmínky mohou ovlivňovat mikrobiotu hostitele (Correa-Fiz et al. 2019).

Fyziologické a funkční výhody mikrobiálních společenstev spojených s hostitelem jsou náchylné k narušení několika antropogenními faktory. Těmi mohou být odlesňování, změny ve využívání půdy, urbanizace a zjetí (Malukiewicz et al. 2022). Intenzivní chov vedl k tomu, že prasata jsou většinou chována v uzavřených prostorech, kde jsou vystavena omezené rozmanitosti mikroorganismů. Extrémním případem jsou laboratorní zvířata chovaná v podmínkách, které zcela omezují působení mikroorganismů. Tato zvířata vykazují fyziologické a behaviorální abnormality s narušeným vývojem imunitního systému (Correa-Fiz et al. 2019).

### 3.3.4.3 Domestikace

Domestikace je modelem řízené evoluce. Proces domestikace začal během neolitické revoluce asi před 10 000 lety. Došlo k řízenému výběru člověkem. Malé skupiny jedinců byly odděleny a žily v izolaci od svých divokých forem (Uhr 2014). Domestikovaná zvířata mají zásadní význam pro hospodářství. Během procesu domestikace se u zvířat událo mnoho změn. Hospodářská zvířata často konzumují méně rozmanitou a snadněji stravitelnou stravu než jejich divoce žijící příbuzní. Vynakládají také méně energie na dosažení kalorického příjmu a mohou být vystavena moderním lékařským zásahům včetně léčby antibiotiky (Reese et al. 2021).

Výsledkem domestikace je, že prasata domácí se stále více odlišuje od svého divokého předka. Změny se týkají chování a anatomie i fyziologie téměř všech orgánů (Uhr 2014). Jasným znakem domestikace u prasat je vyšší počet obratlů, zhoršení čichu a snížení poměru hmotnosti mozku k tělesné hmotnosti (Petrelli et al. 2022). Rozdíl můžeme najít i v barvě srsti (Yang et al. 2020). Kromě toho došlo k modifikaci krmných složek a zavedení intenzivního chovu založeného na ad libitním krmení obilovinami a luštěninami (Ushida et al. 2016). Toto stravování způsobilo změny, které domestikace měla na střevní mikrobiom (Reese et al. 2021).

Domestikace významně ovlivnila složení střevních společenstev u různých hostitelů. Vliv domestikace lze z velké části připsat spíše environmentálním než genetickým změnám. Hrál velkou roli při utváření mikrobioty a prostřednictvím chovatelských praktik tak pravděpodobně činí i dnes (Reese et al. 2021). Dnešní domácí prasata nesou mikrobiální populaci spojenou s rychlým růstem, ale špatnou odolností vůči chorobám ve srovnání s divokými prasaty (Yang et al. 2020).

Milani et al. (2017) porovnávali bifidobakteriální populace mezi divokými zvířaty (zajáci, divočáci a vlci) a domestikovanými druhy žijícími v těsném kontaktu s člověkem (králíci, prasata a psi). U domestikovaných druhů odhalili vyšší biodiverzitu bifidobakterií ve srovnání s volně žijícími zvířaty. To podporuje hypotézu, že časté interakce s lidmi a domestikovaný způsob života mohou podporovat zisk dalších bifidobakteriálních taxonů. Ushida et al. (2016) zkoumali dopad domestikace a moderních krmných postupů na složení



střevního mikrobiomu u prasat *Suidae*. Objevili vyšší počet bifidobakterií ve střevě divokých prasat ve srovnání s domácími prasaty. Navrhli, že domestikace či moderní krmné postupy mohly vést k dominanci laktobacilů. Ačkoli jsou totiž bifidobakterie u domácích prasat autochtonními bakteriemi, populační hustota tohoto rodu je při umělém chovu a moderních krmných systémech několikanásobně nižší než u rodu *Lactobacillus*. Usuzují, že původní prasata z čeledi *Suidae* byla modifikována nejprve domestikací, která způsobila nárůst bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Poté zavedení krmiva bohatého na obiloviny vyvolalo dominanci laktobacilů. Ikeda-Ohtsubo et al. (2018) ve své publikaci také uvádí srovnávací studie mikrobioty domácích a divokých prasat. Odhalili, že bakterie rodu *Lactobacillus* a čeledi *Enterobacteriaceae*, které jsou považovány za dominantní skupiny bakterií ve střevní mikrobiotě prasat, nejsou u divokých prasat běžné. Zvýšený výskyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* je údajně spojen s průjmy selat po odstavu. Je proto pravděpodobné, že management chovu má prostřednictvím kolísání střevní mikrobioty významný vliv na zdraví domácích prasat.

Pochopení ústřední role, kterou střevní mikroorganismy hrají, by mohlo pomoci zlepšit životní podmínky domestikovaných zvířat. Vzhledem k období mezi domestikací a industrializací by poznatky o domestikaci mohly pomoci objasnit i střevní mikrobiotu lidí (Reese et al. 2021). Navzdory tomu zůstává efekt domestikace na střevní mikrobiotu nejasný. Stejně tak jako její vztah k vlivu industrializace na člověka (Reese et al. 2019).

#### **3.3.4.4 Hostitel**

Je pravděpodobné, že složení střevní mikrobioty prasat je utvářeno také genetikou hostitele či plemenem. Bylo zjištěno, že různá plemena prasat mají odlišné složení střevní mikrobioty. Rozdíly se vyskytují zejména mezi plemeny ze zámořských zemích (štíhlý typ) a čínskými plemeny (obézní typ) (Huang et al. 2020). Variabilita tělesné hmotnosti prasat vysvětluje odlišnosti v rámci střevní mikrobioty. Bylo zjištěno, že bakteriální diverzita je vyšší u prasat s vyšší tělesnou hmotností a rychlejším růstem (McCormack et al. 2017).

Genotyp hostitele může částečně určovat složení mikrobioty, kterým lze následně ovlivňovat fenotyp hostitele. Z toho vyplývá, že složení mikrobioty by mohlo být částečně dědičné (Yang et al. 2022).

Je dobře známo, že rozdíly mezi pohlavími mají významný vliv na fyziologii a chování zvířat, popisují Wang et al. (2020). Pohlaví však může regulovat i složení střevních mikroorganismů. A to prostřednictvím interakcí pohlavních hormonů s mikroby či pomocí pohlavně specifických imunitních reakcí. Například kastrace mění složení střevní mikrobioty v důsledku nedostatku androgenů. Zjistili, že střevní mikrobiální diverzita samic prasat je vyšší než diverzita samců a kastrovaných samců. Elderman et al. (2018) ve své studii uvádí, že bifidobakterie byly zastoupené více u samic BALB/c myši než u samců. Naznačují korelaci mezi mikrobiotou a střevními populacemi v závislosti na pohlaví a kmeni. Přičemž tyto rozdíly v mikrobiomu by se mohly podílet na rozdílech v imunitních reakcích mezi pohlavími.

### **3.4 Metody charakterizace bifidobakterií izolovaných ze střevní mikrobioty**

Původně byla klasifikace a identifikace bakterií založena výhradně na fenotypových vlastnostech. Od počátku 20. století se k morfologickým znakům začaly postupně přidávat charakteristiky fyziologické, biochemické a chemotaxonomické (Uhlík et al. 2013). Protože tyto metody často závisí na aktivních metabolických procesech příslušných mikroorganismů, je zapotřebí jejich růst, a tedy dlouhá doba kultivace (Bizzini & Greub 2010). Proto se od 60. let fenotypová klasifikace bakteriálních izolátů rozšířila o druhý přístup, a to genotypovou charakterizaci založenou na fylogenetické příbuznosti bakterií (Uhlík et al. 2013). V současné době se molekulární metody založené na analýze DNA běžně využívají, dodávají Böhme et al. (2012), a to hlavně pro svoji rychlost, citlivost a přesnost.

#### **3.4.1 Kultivace a izolace DNA**

Bifidobakterie se izolují z různých matric, jako jsou mléčné výrobky, potraviny na bázi probiotik či výkaly (Quartieri et al. 2016). Obvykle se izolují z fekálních vzorků a kultivují na selektivních médiích (Tang et al. 2008), která umožňují izolaci i stanovení jejich počtu (Quartieri et al. 2016). K izolaci bifidobakterií z tak komplexní populace, jako je střevní mikrobiota, je třeba použít selektivní média umožňující růst bifidobakterií a zároveň inhibující růst ostatních mikroorganismů přítomných ve vzorku (Vlková et al. 2015). Bifidobakterie jsou striktně anaerobní a při jejich kultivaci je třeba dodržovat anaerobní postupy, což znesnadňuje odběr vzorků a manipulaci s nimi (Tang et al. 2008).

Izolace DNA je jedním z nejčastěji používaných postupů v genetice, molekulární biologii a biochemii. Byla již vyvinuta řada metod izolace DNA z různých biomateriálů v závislosti na použitých zdrojích. Dosud vyvinuté metody extrakce mikrobiální DNA jsou dvojího typu: metody buněčné extrakce a metody přímé lýzy. Extrakce buněk závisí na izolaci mikrobiálních buněk z jejich matrice před lýzou za účelem uvolnění DNA. K získání neporušených mikrobiálních buněk využívá série vortexování a centrifugace. Metoda přímé lýzy nevyžaduje izolaci buněk, jen přímou lýzu buněk ve vzorku, po níž je extrahována DNA (Tang et al. 2008).

#### **3.4.2 Fenotypová charakterizace**

Fenotyp je pozorovatelná vlastnost buňky. Tento pojem se používá spíše v širším slova smyslu zahrnující jakoukoli vlastnost buňky (Bochner 2009). Fenotypová identifikace je založena na přímém porovnání fenotypových vlastností neznámých bakterií s vlastnostmi typových kultur (Böhme et al. 2012). Původně byly všechny bakterie klasifikovány na základě fenotypových charakteristik poté, co byly izolovány v čisté kultuře (Uhlík et al. 2013).

Tradiční taxonomie bakterií byla a zatím stále významně je založena na fenotypových vlastnostech (Purkrťová et al. 2018). Obecná fenotypová kritéria zahrnují morfologické, fyziologické, biochemické a nutriční charakteristiky (Ventura et al. 2001). Ke sledovaným

fenotypovým vlastnostem se řadí morfologie buněk a kolonií, optimální kultivační podmínky, požadavky na výživu či průkaz aktivity specifických enzymů (Purkrťová et al. 2018). V případě bifidobakterií hraje významnou roli enzym fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza (F6PPK), který slouží jako taxonomický nástroj pro identifikaci celého rodu *Bifidobacterium*. Katalyzuje štěpení fruktóza-6-fosfátu na erytróza-4-fosfát a acetylfosfát (Sgorbati et al. 1995). Tato hexózová fermentační dráha poskytuje z 1 molu glukózy až 2,5 molekuly ATP, 1,5 mol acetátu a 1 mol laktátu. Meziprodukty jsou nakonec přeměněny na mastné kyseliny s krátkým řetězcem a další organické sloučeniny, z nichž některé mohou být prospěšné pro hostitele (Pokusaeva et al. 2011). Dále k fenotypovým vlastnostem patří také Gramovo barvení (Bizzini & Greub 2010) či identifikace produktů fermentace (Tannock 1999). Všechny tyto fenotypové znaky přitom představují důsledek exprese genů kódovaných v DNA bakterií. Hlavní úkol fenotypové identifikace je výběr reprezentativní skupiny znaků, která umožní spolehlivou identifikaci nebo alespoň dostatečné odlišení cílové skupiny mikroorganismů. Přesnost identifikace je úměrná znalostem o fenotypových vlastnostech daného rodu či druhu a počtu provedených testů (Purkrťová et al. 2018).

Ačkoli některé z fenotypových testů jsou provedeny během několika minut, úplná identifikace potřebuje většinou více času. Přičemž doba se výrazně prodlužuje, pokud je růst mikroorganismu pomalý nebo obtížný (Carbonnelle et al. 2011). Všechny tyto fenotypové metody také trpí nedostatečnou reprodukovatelností, která je způsobena kultivačními podmínkami v různých laboratořích a různorodostí kmenů, které tvoří uznávané druhy (Ventura et al. 2004).

### 3.4.3 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) funguje na principu detekce poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) bioanalytu (Carbonnelle et al. 2011) a je známá již více než sto let. V průběhu minulého století byly principy MS dále rozvíjeny a zdokonalovány, především v oblasti chemie a biochemie pro charakterizaci neznámých sloučenin a komplexů (Bizzini & Greub 2010). První pokusy o její využití pro charakterizaci mikroorganismů byly učiněny v roce 1975 (Anhalt & Fenselau 1975). Metody MS se začaly využívat také k identifikaci mikroorganismů či zjišťování taxonomie a složení bakteriálních buněk. Mají vysokou rozlišovací schopnost a citlivost. Příprava vzorků je jednoduchá a reprodukovatelná. Většina laborantů může snadno provádět analýzu nezpracovaných dat a identifikovat mikroorganismy pomocí souvisejícího softwaru (Clark et al. 2013).

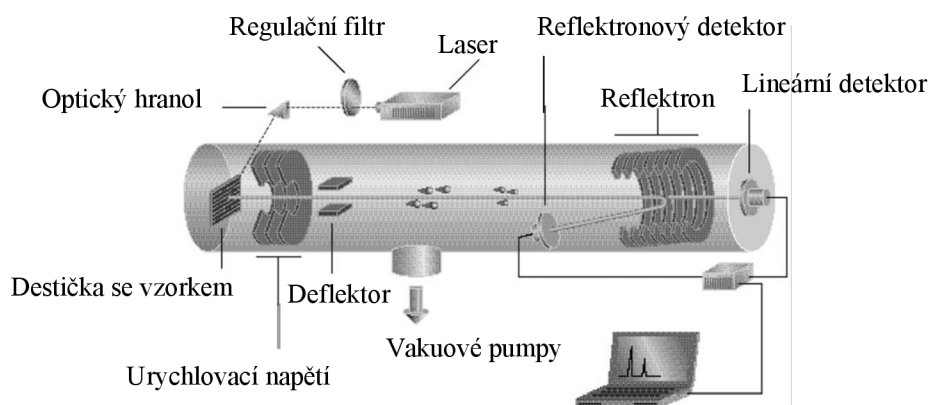
S nástupem proteomiky se urychlil výzkum alternativních metod MS, který vyústil ve vývoj měkké ionizační techniky – princip, na kterém je založena hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem, zkráceně MALDI-TOF MS (Theel 2013). Měkká ionizace proteinů má zásadní význam pro metody identifikace bakterií, protože umožňuje analýzu nejen velkých biomolekul, ale také ribozomálních proteinů. MALDI-TOF MS byla poprvé představena v roce 1987 a následně oceněna Nobelovou cenou v roce 2002 (Clark et al. 2013). Krátce po jejím zavedení se začala využívat pro studium bakteriálních biopolymerů, doplňuje Lay (2001) ve svém článku. Je založena na analýze fenotypových znaků. Jde však o proteomickou metodu, která pro

identifikaci využívá hmotnostní spektrum intracelulárních proteinů přítomných v buňce (Purkrtová et al. 2018). Tato technologie je automatizovaná, vysoce výkonná a použitelná pro širokou škálu běžných i méně známých mikroorganismů (Patel 2015).

#### 3.4.3.1.1 Přístroj

Komerčně dostupná zařízení MALDI-TOF MS určená pro použití v klinických mikrobiologických laboratořích nevyžadují specifické vybavení, kromě obvyklého elektrického a počítačového připojení se softwarem. Mechanické rozhraní hmotnostního spektrometru se obvykle skládá z malé schránky umožňující zavedení cílové destičky (Bizzini & Greub 2010).

Analyt se detekuje pomocí různých typů hmotnostních analyzátorů, jako jsou kvadrupólové hmotnostní analyzátoři, analyzátoři s iontovou pastí, analyzátoři s dobou letu (TOF) a další. Pro identifikaci mikroorganismů se používají především hmotnostní analyzátoři TOF (Singhal et al. 2015). Pulzní laser v MALDI je ideální pro spojení s TOF, jelikož přesně určuje okamžik vzniku iontu (Kadlčík et al. 2002). Přístroj MALDI-TOF MS zobrazuje **Obrázek 6**.



Obrázek 6: Schéma MALDI TOF hmotnostního spektrometru, upraveno dle Kadlčík et al. (2002)

#### 3.4.3.1.2 Matrice

Matrice používaná v MALDI-TOF MS je obecně krystalická pevná látka, která může ve vakuu snadno vytvářet ionty. Je nezbytná pro úspěšnou ionizaci vzorku, protože slouží jako nosná struktura a dodavatel protonů pro ionizaci vzorku. Chemická matrice umožňuje produkci neporušených iontů v plynné fázi z velkých, netěkavých a tepelně labilních sloučenin, jako jsou proteiny (Clark et al. 2013). Je vybírána jak pro svou účinnou desorpci do plynné fáze, tak pro svou schopnost účinně absorbovat většinu pulzní ionizační energie, čímž chrání molekuly vzorku před degradací (Theel 2013). Zároveň způsobuje odpařování malé části cílového substrátu, uvádí Clark et al. (2013).

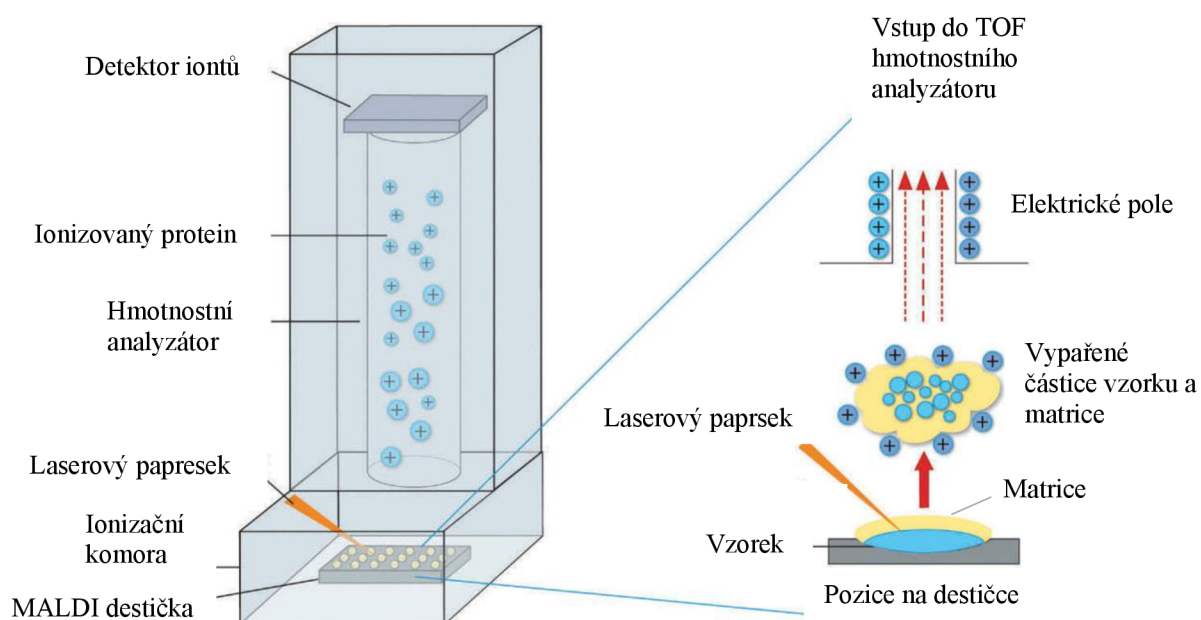
Roztok matrice se skládá z vody a směsi organických rozpouštědel obsahujících ethanol/methanol nebo acetonitril a silné kyseliny, které rozpouští matrici. Rozpouštědla

pronikají buněčnou stěnou mikroorganismů a extrahují intracelulární proteiny (Singhal et al. 2015). Musí být zároveň kompatibilní se vzorkem, aby se vytvořila účinná směs matrice a vzorku (Clark et al. 2013).

V případě MALDI-TOF MS, která využívá UV laser, musí mít matrice součástí svého složení silný chromofor, který pomáhá absorbovat energii. Chromofory se vybírají na základě jejich schopnosti absorbovat specifické vlnové délky laseru, což vede k následné excitaci molekul matrice (Clark et al. 2013).

### 3.4.3.1.3 Princip metody

Principem MALDI-TOF MS je stanovení molekulové hmotnosti zkoumaného vzorku ionizací laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detekcí doby letu (Staněk & Prusík 2020), **Obrázek 7**.



Obrázek 7: Princip metody MALDI TOF MS, upraveno dle Theel (2013)

Identifikace vzorku začíná jeho nanesením do definované oblasti na cílové destičce. Po umístění je vzorek překryt matricí (Theel 2013). Připravená cílová destička se následně zasune do MALDI-TOF přístroje. Každý vzorek se ozáří krátkými pulzy energie UV laserem (v komerčních přístrojích o obvyklé vlnové délce 337 nm). Laser vyvolá rychlou sublimaci matrice i vzorku z pevné fáze do fáze plynné, čímž se vytvoří oblaka obsahující ionty z matrice i vzorku (Clark et al. 2013), jak znázorňuje **Obrázek 7**. Nejdříve se ionizuje matrice, která předá náboj analytu a převede ho také do ionizovaného stavu, zmiňují ve svém článku Friedecký & Lemr (2012). Vzniklé kationty v plynné formě jsou následně urychleny elektromagnetickým polem a prolétávají vakuovou letovou trubicí, tedy hmotnostním analyzátozem doby letu (TOF). Druhá mocnina doby letu, času potřebného k dosažení

detektoru, každého kationtu je úměrná poměru jeho hmotnosti ( $m$ ) a náboje ( $z$ ), který je obvykle roven jedné (Purkrťová et al. 2018). Protože každý analyt vzorku má identický kladný náboj (Theel 2013) a urychlením v elektrickém poli je dodána stejná kinetická energie (Kadlčík et al. 2002), ionty jsou nakonec separovány na základě rozdílu jejich hmotností. Těžší ionty proletí hmotnostním analyzátozem nižší rychlostí než ionty lehčí (Theel 2013). Detektor na konci vakuové trubice poté změří celkovou dobu letu ionizovaných molekul a jejich množství v čase (Cassagne et al. 2016). Výsledkem je hmotnostní spektrum testovaného mikroorganismu, v němž se na ose  $x$  nachází  $m/z$  a na ose  $y$  je umístěna intenzita fragmentů, uvádí Cassagne et al. (2016).

Současné MALDI-TOF spektrometry obsahují na zadním konci letové trubice iontové zrcadlo neboli reflektron, který slouží ke zpětnému odrazu iontů přes letovou trubici do reflektronového detektoru, jak zobrazuje **Obrázek 6**. Tento reflektron tak nejenže prodlužuje délku letu, ale také koriguje malé rozdíly v energii iontů (Singhal et al. 2015). Zároveň prodloužením dráhy letu a zaostřovacím efektem se zvyšuje rozlišení. Ionty se stejným poměrem  $m/z$ , ale vyšší kinetickou energií pronikají hlouběji do reflektronu, čímž se jim prodlouží doba letu vůči iontům s nižší kinetickou energií (Kadlčík et al. 2002).

Protože se složení proteinů u různých bakteriálních druhů (a dokonce i u různých bakteriálních kmenů a poddruhů) liší, jsou generována různá spektra, což umožní rozlišit blízké příbuzné organismy (Clark et al. 2013). Získané spektrum proteinů se následně porovná s databází spekter vybraných referenčních kmenů mikroorganismů (Purkrťová et al. 2018). A přiřadí se buď ke stejným, nebo nejpříbuznějším hmotnostním spektrům obsažených v databázi (Clark et al. 2013). Na základě podobnosti je poté mikroorganismus identifikován na úrovni rodu, druhu nebo poddruhu (Cassagne et al. 2016).

#### 3.4.4 Genotypová charakterizace

V současné době je fenotypová charakterizace často nahrazována genotypovými metodami, které nabízejí větší reprodukovatelnost, úsporu času a práce a poskytují přesnější výsledky (Křížová et al. 2008). Genotypové metody jsou využívány ke zjištění míry příbuznosti mezi jednotlivými izoláty daného druhu získanými z různých zdrojů v různém čase, uvádí Demnerová (2012).

Identifikační metody založené na DNA se zaměřují spíše na složení nukleových kyselin mikroorganismů než na expresi fenotypových znaků kódovaných příslušnými geny. Tím zamezují variabilitě vyvolané regulací genů vlivem prostředí (Mattarelli et al. 2014). Nukleové kyseliny jsou univerzální a sekvence jejich nukleotidových bází není ovlivněna kultivačními podmínkami. Analýza nukleových kyselin tak poskytuje základ pro identifikační metody, které jsou reprodukovatelné mezi jednotlivými laboratořemi (Tannock 1999). Tyto metody však potřebují vyšší náklady vzhledem k tomu, že vyžadují specifické vybavení a kvalifikovanější personál, dodávají ve svém článku Böhme et al. (2012).

Díky rozvoji moderní populační genetiky, ekologie a genomiky taxonomie bifidobakterií rychle pokročila. V současnosti se k detekci a identifikaci bifidobakteriálních druhů používají metody založené na sekvenování genomu či specifických genů (16S rRNA, *recA*, *tufA*, *groEL*, *clpC*, *fusA*) (Sun et al. 2015). Tyto univerzálně konzervované makromolekuly se staly standardem v taxonomii bifidobakterií. Přesto několik studií vyjádřilo

obavy, že fylogenetické stromy s jedním genem nemusí adekvátně odrážet fylogenetické vztahy. Proto nejspolehlivější obraz evolučních vztahů mezi bakteriemi vytváří fylogenetický strom (tzv. superstrom) založený na souboru kombinovaných konzervovaných orthologických proteinů (Ventura et al. 2007a).

Nedávný srovnávací výzkum genomu zahrnující 69 bifidobakteriálních taxonů si stanovil cíl objasnit fylogenetickou příbuznost mezi bifidobakteriálními druhy. Umožnil identifikaci 261 shluků orthologických genů (COG) společných všem analyzovaným genomům. Následné pořadí sekvencí odpovídající proteinům umožnilo vytvořit fylogenetický superstrom bifidobakterií, který zdůrazňuje rozdělení rodu do 10 odlišných fylogenetických skupin. Tyto skupiny znázorňuje **Obrázek 2**. Bez ohledu na použitou metodu zaujímá nejbližší pozici u kořene stromu skupina *B. asteroides*. To podporuje dříve navrženou teorii, že tato fylogenetická skupina má nejbližší genetický vztah k evolučnímu předkovi bifidobakterií (Alessandri et al. 2021).

Genotypové metody jsou nejslibnější pro rychlou a přesnou identifikaci bifidobakterií (Tannock 1999). Přesná klasifikace kmenů na základě molekulárně genetických metod je jedním ze základních předpokladů pro využití těchto mikroorganismů jako probiotika (Mekadim et al. 2019).

#### 3.4.4.1 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) způsobila revoluci v celé biologii. Jedná se v podstatě o replikaci DNA *in vitro* (Madigan et al. 2015) používanou ke zvýšení počtu specifických sekvencí DNA ve vzorku (Mandal et al. 2011). Dokáže zmnožit segmenty DNA až miliarda krát procesem nazývaným amplifikace. Tím se získá velké množství specifických genů nebo jiných segmentů DNA, které lze použít pro řadu aplikací v molekulární biologii (Madigan et al. 2015). Satokari et al. (2003) doplňují, že amplifikace DNA pomocí PCR je jedním z nejjednodušších a nejrychlejších způsobů detekce specifických sekvencí. Pomocí PCR lze amplifikovat specifické fragmenty DNA nebo i celý gen, uvádí Ward & Roy (2005).

PCR je rychlá, mimořádně citlivá, specifická, vysoce účinná a snadno ovladatelná metoda (Ward & Roy 2005). Výhodou této techniky pro detekci, identifikaci a charakterizaci bifidobakterií je, že PCR nevyžaduje anaerobní podmínky ve srovnání s klasickou kultivační metodou (Ward & Roy 2005).

PCR využívá enzym DNA polymerázu, který přirozeně duplikuje molekuly DNA. K zahájení syntézy DNA se používají uměle syntetizované oligonukleotidové primery, které jsou však vyrobeny z DNA (Madigan et al. 2015). Primery s definovanou sekvencí se vážou na konce cílové oblasti DNA na templátových vláknech. Umožňují DNA polymeráze syntetizovat nové vlákno DNA, komplementární k templátovému a navazující na 3' konec primeru. To znamená, že templát DNA nevykazující komplementaritu k primerům nebude amplifikován (Hugerth & Andersson 2017). Madigan et al. (2015) zmiňují, že PCR ve skutečnosti nekopíruje celé molekuly DNA, ale amplifikuje úseky až několika tisíc párů bází z větší templátové molekuly DNA.

Touto metodou je specifický fragment DNA amplifikován během cyklického procesu:

- 1) Templátová molekula DNA se zahříváním za vysoké teploty denaturuje, čímž se jednotlivá vlákna oddělí od sebe.
- 2) Napojí se dva syntetické oligonukleotidové primery DNA.
- 3) DNA polymeráza poté prodlužuje řetězec syntézou kopie původního řetězce templátové DNA.
- 4) Směs se znovu zahřeje pro oddělení vláken, ale nyní je cílový segment ve dvojnásobném množství oproti původnímu. Celý proces se takto opakuje (Madigan et al. 2015).

Obklopením oblasti dvěma primery se během každého cyklu amplifikace množství produktu zdvojnásobí, což vede k jeho exponenciálnímu nárůstu. Odtud pochází termín polymerázová řetězová reakce (Hugerth & Andersson 2017). Za několik hodin lze v automatickém zařízení PCR zvaném termocykler vytvořit velké množství amplifikované DNA s použitím několika molekul výchozí templátové DNA (Madigan et al. 2015). Teoreticky může PCR amplifikovat jednu kopii DNA milionkrát za méně než 2 hodiny (Mandal et al. 2011). Zisk DNA během PCR je velmi cenný pro klonování genů či pro účely sekvenování. Geny, které jsou předmětem zájmu, lze totiž snadno amplifikovat, pokud jsou známy doprovodné sekvence (Madigan et al. 2015).

Protože se k denuraci dvouvláknových kopií DNA *in vitro* používají vysoké teploty, používá se termostabilní DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, nazývaná Taq polymeráza. Pro uspokojení komerční poptávky po termostabilních DNA polymerázách byly geny kódující tyto enzymy klonovány do *E. coli*, což umožňuje výrobu enzymů ve velkém množství (Madigan et al. 2015).

Přestože je PCR výkonná technologie, reakce mohou být výrazně ovlivněny přítomností inhibičních sloučenin (žlučové soli nebo akriřavin) v potravinách a selektivních médiích. Dalším problémem rutinního použití PCR v laboratoři jsou poměrně komplikované postupy. PCR také nedokáže rozlišit mezi živými a mrtvými buňkami, a proto poskytuje více falešně negativních výsledků (Mandal et al. 2011).

#### 3.4.4.2 Fingerprintové metody

DNA fingerprinting zobrazuje sady fragmentů DNA z daného vzorku DNA. Většina metod fingerprintingu se využívá k detekci vzniklých fragmentů PCR (Vos et al. 1995). Fingerprinting, založený na PCR, zahrnuje amplifikaci konkrétních sekvencí DNA pomocí specifických nebo libovolných primerů (Ward & Roy 2005). Metody fingerprintingu mají hlavní nevýhodu v tom, že jsou velmi citlivé na reakční podmínky, kvalitu DNA a teplotní režimy PCR, uvádí Vos et al. (1995).

Příkladem fingerprintové metody založené na amplifikaci úseků ohraničených repetitivními sekvencemi je palindromická analýza repetitivních prvků (REP-PCR), popisuje Demnerová (2012). Tato PCR metoda používá primery, které odpovídají krátkým repetitivním sekvencím (Ward & Roy 2005). Nejčastěji se používají čtyři typy primerů – REP, ERIC, BOX či GTG<sub>5</sub>. REP-PCR s použitím primerů BOXA1R a GTG<sub>5</sub> byla s úspěchem použita pro identifikaci a charakterizaci některých druhů bifidobakterií (Křížová et al. 2008).



To potvrzují i Young Park et al. (2011), kteří dodávají, že tato metoda s primerem BOXA1R představuje významnou genotypovou metodu pro identifikaci širokého spektra bifidobakterií na druhové úrovni.

Další fingerprintingová metoda je například náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD), kde se jako primery v PCR používají obvykle 10bázové oligonukleotidy s náhodnou sekvencí. Primery se napojí na komplementární nebo částečně komplementární sekvence templátové DNA. Pomocí PCR se tímto získají náhodně amplifikované fragmenty DNA (Vincent et al. 1998). Výhodou je, že tato metoda umožňuje rozlišovat druhy a do jisté míry i kmény v rámci téhož druhu (Satokari et al. 2003). Rozdíly v genomu mezi jednotlivými bakteriálními druhy představují rozdíly ve velikosti a počtu získaných fragmentů DNA. Po elektroforéze v agarózovém gelu a obarvení barvivem jsou fragmenty vizualizovány pod UV světlem (Vincent et al. 1998). Tato metoda se často používá k charakterizaci probiotických bakterií (Ward & Roy 2005). Široce se uplatňuje při typizaci laktobacilů a bifidobakterií z různých prostředí. Technika RAPD-PCR je jednoduchá a rychlá, ale pro reprodukovatelnost výsledků je nutná pečlivá optimalizace a standardizace (Satokari et al. 2003).

Při fingerprintingu bakteriálních společenstev se používají také techniky teplotní a denaturační gradientové gelové elektroforézy (TGGE a DGGE). V praxi se ze vzorku extrahuje RNA nebo DNA a pomocí primerů se amplifikuje fragment rRNA nebo rDNA. Produkty PCR (amplikony) s přibližně stejnou velikostí ale rozdílnou sekvencí se posléze oddělí pomocí gelové elektroforézy. Po obarvení jsou amplikony s různými sekvencemi zobrazeny v gelu jako oddělené fragmenty, které tvoří otisk mikrobiální komunity (Satokari et al. 2003).

#### **3.4.4.3 Sekvenace genu 16S rRNA**

Studie sekvencí rRNA na konci 70. let 20. století poskytla klíč k fylogenezi prokaryot. Zavedení analýzy genu kódujícího 16S podjednotku ribosomální RNA znamenalo molekulární revoluci. Lépe, než jakákoli jiná metoda taxonomie dokázala zařadit mikroorganismy do struktury fylogenetických vztahů. To vedlo k reorganizaci taxonomie na úrovni druhů (Biavati & Mattarelli 2006). RNA malé ribosomální podjednotky se stala základem mikrobiální taxonomie, dodávají Uhlík et al. (2013), a díky ní byla odhalena drtivá většina diverzity mikrobiálního světa.

Sekvenování genu 16S rRNA je běžným nástrojem pro identifikaci bakterií (Böhme et al. 2012). Některé vlastnosti této molekuly předurčují její použití jako fylogenetického markeru. Jedná se o vlastnosti jako přítomnost napříč říší prokaryot, konstantní funkce, malé evoluční změny, kombinace vysoce konzervovaných úseků pro bakteriální říši a variabilních úseků specifických pro daný taxon (Uhlík et al. 2013). Protože gen 16S rRNA má vysoce konzervované a variabilní oblasti, lze syntetizovat primery specifické pro gen 16S rRNA z různých taxonomických skupin a použít je k průzkumu různých stanovišť pro specifické skupiny organismů (Madigan et al. 2015). Jsou navrženy univerzální primery, které se vážou na konzervované oblasti a amplifikují variabilní oblasti. Amplifikace se provádí pomocí PCR (Böhme et al. 2012).

Pro velký počet druhů byly určeny sekvence genu 16S rRNA a jsou dostupné v databázích jako je například GenBank Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI). Pro identifikaci bakterií se sekvence 16S rRNA neznámého kmene porovná s databází publikovaných sekvencí a pomocí běžného bioinformačního nástroje BLAST se určí nejpodobnější bakteriální kmeny (Böhme et al. 2012).

Nevýhody této metody jsou chybějící standardizace experimentálních protokolů nebo 2–5% odchylka v sekvencích jednotlivých kopií tohoto genu v rámci jednoho genomu (Purkrťová et al. 2018). Zároveň nemůže poskytnout dostatečné rozlišení pro blízce příbuzné bakteriální kmeny (Jian et al. 2001). Tuto metodu využívají především velké klinické a referenční laboratoře, neboť často vyžaduje specializované přístrojové vybavení a vyhrazené laboratorní prostory a personál (Clark et al. 2013).

Celá čeleď *Bifidobacteriaceae* byla založena na základě sekvencí 16S rDNA/rRNA a přítomnosti specifických nukleotidů (Killer et al. 2010). Fylogeneze, klasifikace a ekologické studie bifidobakterií na základě 16S rRNA genu však mohou být zavádějící kvůli přítomnosti různých kopií v genomech. Kromě toho také existují druhy/poddruhy bifidobakterií, které sdílejí velmi podobné sekvence nukleotidů 16S rRNA genu (Killer et al. 2018a), kdy je mezi nimi více než 97% podobnost (Satokari et al. 2003). Dle autorů Ward & Roy (2005) se jedná například o *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* (podobnost 99,1 %) nebo *B. animalis* subsp. *lactis* a *B. animalis* subsp. *animalis* (podobnost 99,0 %).

#### 3.4.4.4 Celogenomové sekvenování

Celogenomové sekvenování nukleotidů změnilo genetický, biochemický a molekulárně biologický výzkum bakterií a mnoha vyšších organismů (Ventura et al. 2007a). Původně bylo v roce 1979 popsáno Sangerovo sekvenování, jež představovalo první krok k usnadnění sekvenování genomu. Bylo ale pomalé a pracné a vyžadovalo genetickou mapu pro sestavení sekvenovaných fragmentů. S rozvojem výpočetní techniky a softwaru se tato strategie vyvinula v celogenomové sekvenování. Tato metoda vedla k prvnímu průlomovému sekvenovanému genomu volně žijícího organismu (Kwong et al. 2015).

Výhoda celogenomového sekvenování je sekvenace celé chromozomální DNA. Tím se pokryjí promotorové a regulační sekvence a poskytne se informace o úplném mutačním profilu daného genomu. Zahrnuje *de novo* sekvenování a resekvenování. Obě metody sekvenují genomy, ale při resekvenování je k dispozici referenční sekvence, na kterou se nová sekvence zpětně mapuje (Koubková et al. 2014). Sekvenování genomu je zlatým standardem pro zkoumání kompletního genetického vybavení organismu a poskytuje prediktivní vodítka týkající se genetických faktorů, které určují adaptivní funkce specifické pro prostředí, v němž organismus žije (Ventura et al. 2007a). Zhou et al. (2011) ve své publikaci uvádí, že velkoplošné sekvenování genomů a související genomické technologie způsobily revoluci ve studiu mikrobiálních společenstev. Nicméně Killer et al. (2018b) dodávají, že sekvenování celého genomu je časově náročné, vyžaduje speciální vybavení a je značně drahé.

Začátkem 21. století se začalo více prosazovat sekvenování genomů střevních komenzálů a symbiontů. První kompletní genom bifidobakteriálního druhu *B. longum* byl

zveřejněn v roce 2002. Sekvenování genomu probiotického kmene představuje zásadní krok k získání primárních informací pro další účely, jako je srovnávací genomika, transkriptomika nebo proteomika. Srovnávací studie genomů jsou velmi užitečné při identifikaci kmenově specifických sekvencí DNA, které mohou být zodpovědné za adaptace těchto kmenů na jejich specifické niky nebo způsob života (Ventura et al. 2007a).

Za základ bakteriální taxonomie jsou od 70. let 20. století považovány fyzikálně chemické metody hybridizace DNA-DNA (Ventura et al. 2007a). Lauer & Kandler (1983) uvedli, že hybridizace DNA-DNA je účinným standardem pro stanovení druhu v rámci rodu *Bifidobacterium*. Pro členy stejného druhu by měla být homologie DNA-DNA 70 % a výše (Jian et al. 2001) a rozdíl v teplotě tání obou genomických DNA nesmí být vyšší než 5 °C (Ventura et al. 2007a). Míra shody DNA umožňuje hierarchické uspořádání v závislosti na tom, jak docházelo v průběhu evoluce k diverzifikaci. Výhodou této metody je univerzálnost daného postupu pro všechny taxonomické skupiny a vysoká spolehlivost. Proto porovnání kompletních molekul DNA-DNA zůstává vhodnou metodou pro identifikaci druhu a určení míry mezidruhové příbuznosti (Purkrťová et al. 2018). Tato metoda má také nevýhody – je poměrně obtížně proveditelná a standardizovatelná napříč laboratořemi a mnohdy bývá zatížena vysokou experimentální chybou (Uhlík et al. 2013).

## 4 Metodika

Pro vytvoření sbírky divokých kmenů bifidobakterií bylo v letech 2013–2020 v rámci projektů Ministerstva zemědělství České republiky QK1910351 a MZE-RO0318 odebráno téměř 200 fekálních vzorků z tenkého a tlustého střeva divokých a domácích prasat. Izoláty bifidobakterií charakterizované v rámci této diplomové práce pocházely ze 133 fekálních vzorků. Fekální vzorky byly odebrány celkem z 88 hostitelů: divokých (n = 67) a domácích (n = 21) prasat. Jednotliví hostitelé pocházeli z různých lokalit v České republice, konkrétně z Radlic u Zásnuk, Hlíny u Ivančic, obce Niva (Boskovice), obce Rohy u Hodova (Velké Meziříčí), obce Tuř (Jičín), Doupova (Karlovy Vary), Obory Řícmanice (u Brna), Obory Lány, Tišnova (Předklášteří), Hynčiny (Šumperk), ze zemědělských podniků GenAgro Říčany, Agrofarm (Žďár nad Sázavou) a Moras Moravany, Zemědělského družstva Podlesí (Čechtín), Divoké Šárky v Praze, Boješic, obce Hlavenec, České zemědělské univerzity v Praze (ČZU) a Kouřimi. Vzorky byly v rámci zmínovaných projektů získávány ve spolupráci s mysliveckými spolky a chovateli v dané lokalitě a následně byly kontinuálně podrobeny mikrobiologickým rozborům ve Výzkumném ústavu potravinářském v Praze. Pro kultivaci bifidobakterií bylo použito modifikované selektivní Wilkins-Chalgren médium s mupirocinem a kyselinou octovou (WSP-MUP; Rada & Petr 2000) a Wilkins-Chalgren médium s norfloxacinem, mupirocinem a kyselinou octovou (WSP-NORF; Vlková et al. 2015). Následující mikrobiologický rozbor deskovou metodou byl proveden analogicky podle Modrackova et al. (2021). Pro kultivaci odebraných izolátů byl využit neselektivní Wilkins-Chalgren bujón se sójovým peptonem (WSP bujón), dle údajů, jenž obsahuje **Tabulka 4**, s vytvořenými anaerobními podmínkami ve zkumavce (Hungate & Macy 1973). Vybrané izoláty poté byly uchovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v 30% glycerolu (VWR, USA). Tímto způsobem byla vytvořena široká bakteriální sbírka divokých kmenů bifidobakterií (n = 584). V rámci této diplomové práce byla následně celá tato sbírka bifidobakterií identifikována pomocí MALDI-TOF MS na úroveň druhu a pro stanovení kmenové variability byly vybrané izoláty dále charakterizovány fingerprintovou metodou REP-PCR.

*Tabulka 4: Wilkins-Chalgren bujón se sójovým peptonem*

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Wilkins-Chaldren bujón (Oxoid, UK)	33 g
Soya pepton (Oxoid)	5 g
Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA)	1 ml
L-cystein (Sigma-Aldrich)	0,5 g

### 4.1 Příprava kultur bifidobakterií

Izoláty ze sbírky bifidobakterií v mrazáku byly vždy pro následnou identifikaci a charakterizaci asepticky přeočkovány po 0,4 ml do zkumavky s 9 ml WSP bujónu. Následně byly anaerobně kultivovány při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodin. U takto čerstvě narostlé kultury byla

vždy zkontrolována čistota pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse E 200LED MV RS, Japonsko).

## 4.2 MALDI-TOF MS identifikace

Kultury mikroorganismů lze pomocí MALDI-TOF MS identifikovat buď vykultivované na pevném kultivačním médiu, nebo v bujónu (Clark et al. 2013). U námi identifikovaných vzorků bifidobakterií byly k identifikaci použity čisté kmeny čerstvě narostlé ve WSP bujónu. Před nanesením na MALDI destičku a samotným měřením bylo nutné provést následující kroky.

### ○ Příprava vzorků a měření

Z čerstvě narostlé čisté kultury bifidobakterií byl injekční stříkačkou odebrán 1 ml do 1,5ml Eppendorf zkumavky pro identifikaci MALDI-TOF MS s ethanol-formic acid extraction dle instrukcí výrobce (Bruker Daltonik GmbH, Německo). Následně byla přenesená kultura stočena na centrifuze při 14 500 otáčkách za minutu po dobu 2 minut. Na dně zkumavky se vytvořila usazenina neboli peleta, přičemž zbylý supernatant byl odstraněn. Peleta byla resuspendována v 500  $\mu$ l 70% ethanolu (PENTA, Česká Republika).

Vzniklá suspenze byla následně zvortexována a stočena na centrifuze při rychlosti 14 500 otáček za minutu po dobu 2 minut. Veškerý ethanol byl odstraněn a peleta ponechána za pokojové teploty k sušení po dobu 10 minut. Následně byla provedena resuspendace pelety v 15  $\mu$ l 70% kyselině mravenčí (Honeywell Fluka<sup>TM</sup>, USA) a přidání 15  $\mu$ l acetonitrilu (Sigma-Aldrich) pro extrakci intracelulárních proteinů. Roztok byl poté zvortexován a znovu stočen na 14 500 otáček za minutu po dobu 2 minut. Nakonec bylo z výsledného roztoku nadávkován 1  $\mu$ l supernatantu ve dvou kopiích na MALDI destičku. Po zaschnutí byl vzorek překryt 1  $\mu$ l matrice HCCA (kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová, Bruker, Německo). Destička byla následně vložena do přístroje MALDI-TOF MS a analyzována pomocí Bruker Biotyper software (Bruker Daltonics) pro rychlou identifikaci mikroorganismu spolu s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií (Modrackova et al. 2021). Výstupem tohoto měření byla unikátní hmotnostní spektra kultur bifidobakterií.

### ○ Vyhodnocení výsledků

Prostřednictvím algoritmů byla následně určena míra podobnosti mezi získanými neznámými spektry a záznamy v MALDI databázi. Získané skóre se zobrazuje v rozmezí od 0,0 – nulová podobnost do 3,0 – dokonalá shoda. Pro každý testovaný vzorek je uvedeno skóre a identita 10 nejbližších referenčních spekter. V rámci skóre stanovil výrobce mezní intervaly, které uživatelé poskytují jistou identifikaci buď na úrovni rodu (skóre 1,700 až 1,999), nebo na úrovni druhu (skóre  $\geq$  2,000). Každý vzorek s hodnotou  $<$ 1,700 se považuje za neidentifikovaný. Rozmezí pro jednotlivá skóre uvádí **Tabulka 5**.

Tabulka 5: Rozmezí pro identifikovaná skóre u vyhodnocování MALDI-TOF MS výsledků

Skóre	Interpretace	Barva
2,00 – 3,00	Identifikace druhu s vysokou mírou jistoty	zelená
1,70 – 1,99	Identifikace s nízkou mírou jistoty – zaručená identifikace rodu	žlutá
0,00 – 1,69	Identifikace organismu nelze provést	červená

### 4.3 Fingerprintová metoda REP-PCR

Pro charakterizaci vybraných izolátů z nejčtenějších detekovaných skupin bifidobakteriálních druhů u divokých a domácích prasat byla provedena REP-PCR. Jak již bylo zmíněno, jedná se o fingerprintovou metodu založenou na amplifikaci úseků ohraničených repetitivními sekvencemi.

#### 4.3.1 Izolace DNA a PCR

Z čerstvě narostlé čisté kultury bifidobakterií ve WSP bujónu bylo injekční stříkačkou odebráno 0,5 ml do 1,5ml sterilní Eppendorf zkumavky pro izolaci DNA. DNA byla extrahována pomocí PrepMan Ultra™ (Applied Biosystems, USA) dle pokynů výrobce. Předem byl nahřát termostát na 100 °C. Zkumavky byly stočeny v centrifuzě při rychlosti 14 500 otáček po dobu 2 minut. Následně byl ze zkumavek odlit supernatant a peleta byla resuspendována v 50 µl PrepMan Ultra™. Suspenze poté byla vložena do termostatu a zahřáta na 100 °C dobu 10 minut. Poté byla ponechána zchladnout na pokojovou teplotu a následně opět stočena v centrifuzě za stejných podmínek. Nakonec byl ze zkumavky opatrně odpipetován supernatant do nové sterilní Eppendorf zkumavky. Izolovaná DNA byla následně uchována při –20 °C.

Vzorky DNA byly poté použity pro REP-PCR. PCR mix byl připraven z Master mixu (Thermo Fisher Scientific, USA) obsahující reakční pufr, směs nukleotidů a Taq DNA polymerázu, PCR vody (Thermo Fisher Scientific) a primeru GTG<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (Gevers et al. 2001). Složení a množství uvádí **Tabulka 6**. Poté byla PCR směs zvortexována.

Tabulka 6: Složení PCR směsi s množstvím na 1 µl DNA

Komponenty	Množství
Master mix	12,5 µl
Primer GTG <sub>5</sub>	1 µl
PCR voda	10,5 µl
DNA templát	1 µl
<b>Celkem</b>	<b>25 µl</b>

Následně byl přepipetován po 24 µl do PCR mikrozkuvek, ke kterým byl poté doplněn 1 µl DNA daného izolátu bifidobakterie do celkového objemu 25 µl. Směs byla opět

krátce zvortexována. Mikrozkumavky obsahující všechny složky byly umístěny do termocykleru (Bio-Rad, USA) a byla spuštěna samotná PCR reakce. REP-PCR byla provedena dle Gevers et al. (2001). Teplotní režimy pro REP-PCR, jež znázorňuje **Tabulka 7**, probíhaly ve třech opakujících se fázích. Po úvodní denaturaci následovalo 30 cyklů.

*Tabulka 7: Teplotní režimy v termocykleru pro REP-PCR*

Teplotní režimy		
1 cyklus	95 °C	7 minut
30 cyklů	90 °C	3 minuty
	40 °C	1 minuta
	65 °C	8 minut
1 cyklus	65 °C	16 minut

#### 4.3.2 Agarózová gelová elektroforéza

Pro separaci fragmentů PCR produktu byla použita agarózová gelová elektroforéza. Nejprve bylo připraveno 100 ml 0,75krát koncentrovaného TAE (TRIS-kyselina octová-EDTA) pufru (Thermo Fisher Scientific) s přidáním 1 g práškové agarózy (Serva Electrophoresis, Německo). Promíchaná směs byla zahřáta 3 minuty v mikrovlnné troubě. Po vychladnutí bylo do směsi napipetováno 5 µl GelRed barviva (Biotium, USA). Roztok byl nalit do formy s hřebínky pro vytvoření jamek a nechal se ztuhnout při pokojové teplotě (cca 30 minut). Po ztuhnutí byl gel přemístěn do elektroforézy naplněné TAE pufrem a byly vyjmuty hřebínky, které zanechaly komůrky pro napipetování PCR produkt do gelu. Poté byl TAE pufr dolit po rysku PCR vany. Do jamek bylo automatickou pipetou naneseno 5 µl PCR produktu. Do první a poslední jamky bylo napipetováno stejné množství DNA standardu (Thermo Fisher Scientific) pro odhad velikosti pozorovaných fragmentů DNA. Nádoba elektroforézy byla přikryta víkem a separace probíhala při napětí 80 V po dobu 180 minut.

#### 4.3.3 Vizualizace PCR produktu a shluková analýza

Po dokončení elektroforézy byl gel vyjmut a přenesen do UV-transluminátoru (Bio-Rad), ve kterém byl gel prosvícen UV zářením, a separovaná DNA byla vizualizována. Následně byly programem Bio-Rad The Discovery Series Quality one 1-D pořízeny elektroforeogramy zobrazující získané fingerprintové profily, jejichž similarita byla po jejich selekci následně analyzována v programu BioNumerics (Applied Maths, Belgie). Analyzované profily byly vybrány na základě úspěšnosti proběhlé PCR. Pro hodnocení podobnosti byly nastaveny dílčí parametry analýzy: koeficient similarity (Pearsonova korelace, 1% optimalizace a 5% vyhlazení křivky) a shluková analýza (shluková metoda UPGMA s kofegenní korelací).

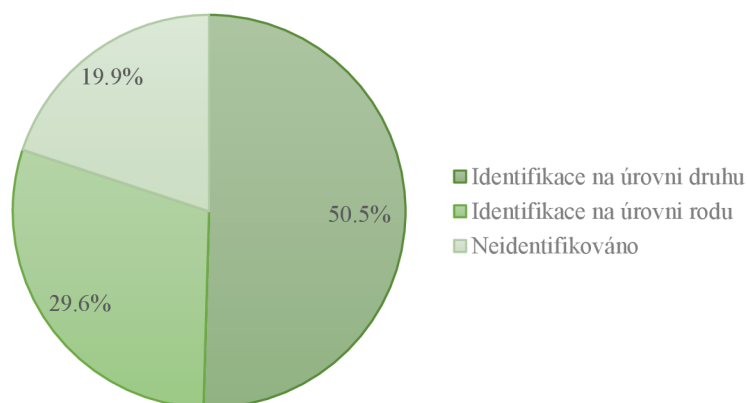
## 5 Výsledky

V rámci této diplomové práce bylo identifikováno a dále charakterizováno 584 kmenů bifidobakterií pocházejících ze sbírky divokých kmenů izolovaných ze 133 fekálních vzorků celkem od 88 hostitelů, konkrétně 67 divokých a 21 domácích prasat.

### 5.1 Identifikace bifidobakterií pomocí MALDI-TOF MS

#### 5.1.1 Úspěšnost identifikace bifidobakterií

MALDI-TOF MS s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií se prokázala jako vhodná pro spolehlivé druhové určení velkého počtu izolátů variabilních bifidobakteriálních druhů. Metodou MALDI-TOF MS s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií bylo analyzováno 584 vyizolovaných kmenů, přičemž byl zjištěn výskyt 37 kontaminantů. Tudíž konečný počet bifidobakterií činil 547 kmenů. Z těchto 547 kmenů bifidobakterií bylo pomocí této metody úspěšně zidentifikováno 438 kmenů se zaručenou identifikací rodu i druhu, tedy 80,1 %. Z nichž na úroveň druhu s vysokou mírou jistoty bylo identifikováno 276 kmenů bifidobakterií (50,5 %) a nejvýše na úroveň rodu 162 kmenů (29,6 %). Identifikaci nebylo možné provést u 109 izolátů (19,9 %). Úspěšnost identifikace touto metodou z celkových 547 kmenů bifidobakterií znázorňuje **Graf 1**. **Tabulka 8** uvádí úspěšnost detekce jednotlivých druhů bifidobakterií v souvislosti s původem prasečího hostitele. U divokých prasat bylo zanalyzováno 59,9 % kmenů bifidobakterií na úroveň druhu a 40,1 % na úroveň rodu. U domácích prasat byla detekce druhu úspěšnější, 72,5 % kmenů bylo identifikováno na úroveň druhu a pouze 27,5 % kmenů na úroveň rodu. S vysokou mírou jistoty bylo u obou skupin prasat zidentifikováno 9 druhů: *B. animalis*, *B. apri*, *B. boum*, *B. globosum*, *B. choerinum*, *B. porcinum*, *B. pseudolongum*, *B. thermacidophilum* a *B. thermophilum*. Pouze s nízkou mírou jistoty byly u divokých prasat detekovány také druhy *B. aerophilum* a *B. chimpanzee*. Druhy *B. animalis*, *B. boum*, *B. pseudolongum* i *B. choerinum* byly ve vysokém počtu úspěšně změřeny na úroveň druhu ve srovnání s identifikací na úroveň rodu. Naopak velký počet kmenů *B. porcinum* byl u divokých i domácích prasat zidentifikován úspěšně pouze na úroveň rodu.



Graf 1: Úspěšnost identifikace bifidobakterií na úroveň druhu, rodu a bez možnosti identifikace

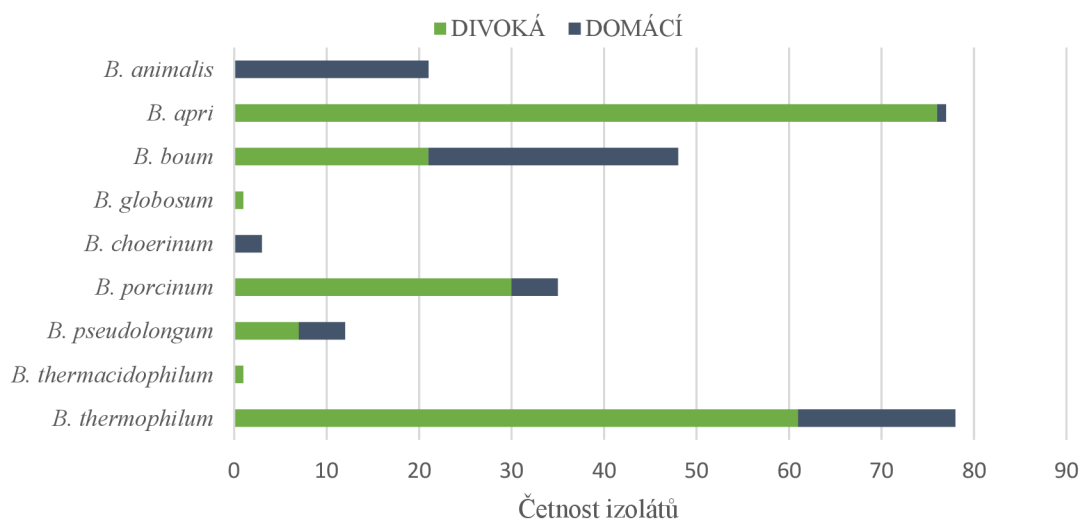


Tabulka 8: Úspěšnost identifikace bifidobakterií na úrovni druhu a rodu u divokých a domácích prasat

Druhy bifidobakterií	Na úrovni druhu		Na úrovni rodu		Celkem
	DIVOKÁ	DOMÁCÍ	DIVOKÁ	DOMÁCÍ	
<i>B. aerophilum</i>	-	-	3	-	3
<i>B. animalis</i>	-	21	-	3	24
<i>B. apri</i>	76	1	50	5	132
<i>B. boum</i>	21	27	3	4	55
<i>B. globosum</i>	1	-	-	-	1
<i>B. chimpanzee</i>	-	-	1	-	1
<i>B. choerinum</i>	-	3	-	-	3
<i>B. porcinum</i>	30	5	37	8	80
<i>B. pseudolongum</i>	7	5	-	1	13
<i>B. thermacidophilum</i>	1	-	4	-	5
<i>B. thermophilum</i>	61	17	34	9	121
<b>Celkem</b>	<b>197</b>	<b>79</b>	<b>132</b>	<b>30</b>	<b>438</b>

### 5.1.2 Druhové zastoupení bifidobakterií u divokých a domácích prasat

Jak již bylo zmíněno, testované kmeny byly zařazeny do 9 různých druhů bifidobakterií. Nejvíce zastoupeným druhem bifidobakterie ve střevní mikrobiotě prasečího hostitele byl *B. thermophilum* (28,3 %), následovaný druhem *B. apri* (27,9 %). Dalšími běžně detekovanými druhy bifidobakterií byly: *B. boum* (17,4 %), *B. porcinum* (12,7 %), *B. animalis* (7,6 %) a *B. pseudolongum* (4,3 %). Naopak vzácně detekovanými druhy byly *B. choerinum* (1,1 %), *B. globosum* (0,4 %) a *B. thermacidophilum* (0,4 %). Jednotlivá zastoupení úspěšně identifikovaných druhů bifidobakterií u prasat obsahuje **Graf 2**, který taktéž zobrazuje počet bifidobakterií u divokých a domácích prasat.



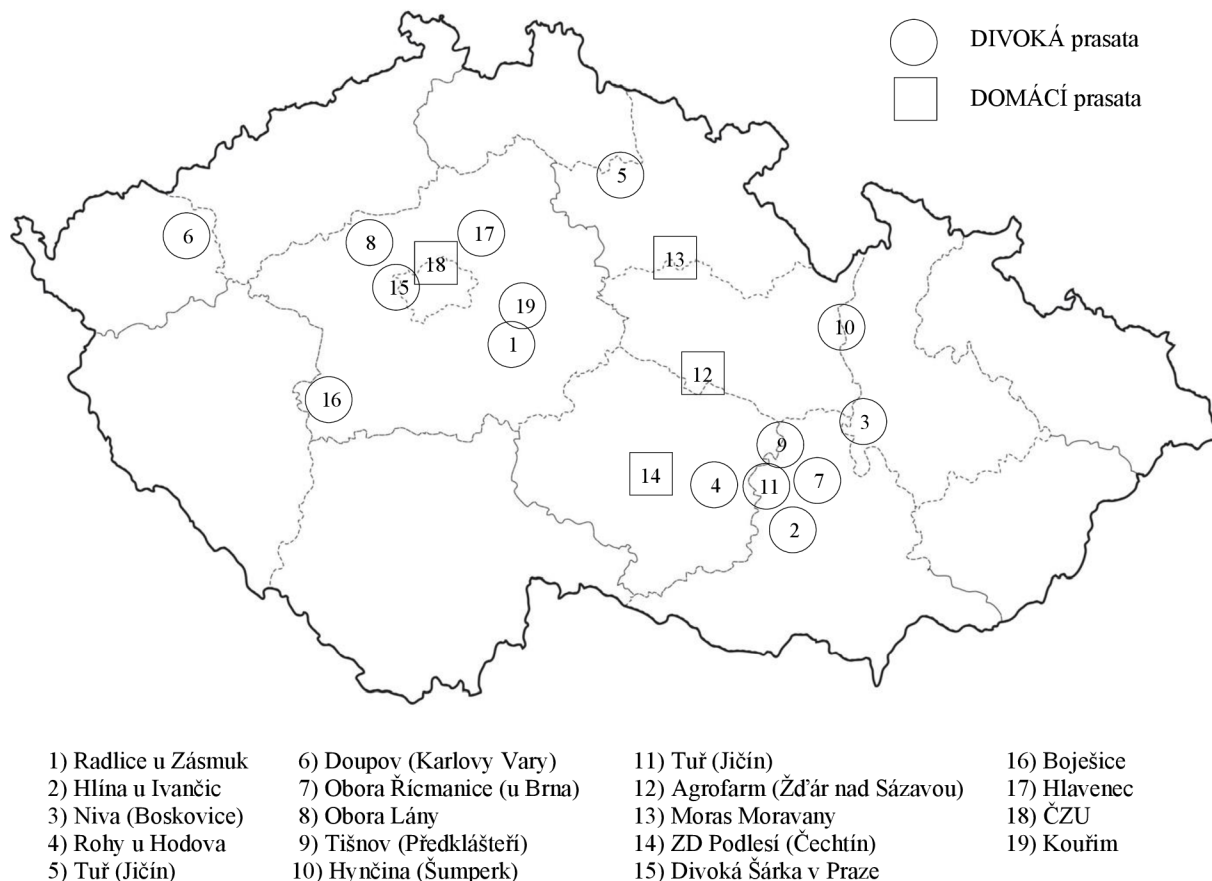
Graf 2: Četnost sledovaných druhů bifidobakterií u divokých a domácích prasat

Divoká a domácí prasata vykazovala stejný počet detekovaných druhů bifidobakterií, avšak s jejich odlišným zastoupením v rámci obou sledovaných skupin. Ve střevní mikrobiotě divokých prasat byly detekovány druhy *B. apri*, *B. boum*, *B. globosum*, *B. porcimum*, *B. pseudolongum*, *B. thermacidophilum* a *B. thermophilum*. Nejvyšší zastoupení z celkového počtu 197 bifidobakteriálních izolátů měl druh *B. apri* (38,6 %) a dále *B. thermophilum* (31,0 %). Nejnižší četnost vykazoval *B. globosum* (0,5 %) a *B. thermacidophilum* (0,5 %), které se vyskytovaly pouze u divokých prasat. Naopak u domácích prasat byly zidentifikovány druhy *B. animalis*, *B. apri*, *B. boum*, *choerinum*, *B. porcimum*, *B. pseudolongum* a *B. thermophilum*. Nejčetnější druh u domácích prasat z celkového počtu 79 bifidobakterií představoval *B. boum* (34,2 %) a následně *B. animalis* (26,6 %). *B. animalis* navíc nebyl u divokých prasat vůbec detekován. Nejméně početným druhem u domácích prasat byl *B. apri* (1,3 %). Přestože je *B. apri* zřejmě hostitelsky specifickým druhem, jeho zastoupení se význaně lišilo v rámci sledovaných skupin, kdy u divokých prasat byl tento druh nejčetnější (38,6 %), zatímco u domácích prasat byl nejméně početným (1,3 %). V menší míře tomu bylo i u druhu *B. porcimum*, jehož zastoupení bylo u divokých prasat vyšší (15,2 %) než u domácích (6,3 %). Naopak podíl druhu *B. boum* u domácích prasat byl ve srovnání s ostatními druhy nejvyšší (34,2 %), zatímco u divokých prasat se pohyboval v nižších hladinách (10,7 %). Zastoupení *B. thermophilum* bylo u divokých (31,0 %) i domácích (21,5 %) prasat poměrně vysoké s ohledem na jejich počet.

Divoká prasata vykazovala vyšší výskyt jedinců s více než 3 detekovanými odlišnými druhy bifidobakterií než domácí prasata. Konkrétně u 9měsíční samice z oblasti Obory Řícmanice (u Brna) byly identifikovány až 4 různé druhy bifidobakterií: *B. apri*, *B. porcimum*, *B. thermacidophilum* a *B. thermophilum*. Nicméně mezi domácími prasaty se také vyskytly dva takoví jedinci. Jednalo se taktéž o samice. Jedna pocházela z farmy Moras Moravany s následujícím zastoupením bifidobakterií: *B. animalis*, *B. porcimum*, *B. pseudolongum* a *B. thermophilum*. Druhá se nacházela v podniku Agrofarm (Žďár nad Sázavou) a detekovány byly druhy *B. apri*, *B. boum*, *B. choerinum* a *B. thermophilum*.

#### ○ Vliv lokality a způsobu chovu na zastoupení bifidobakterií

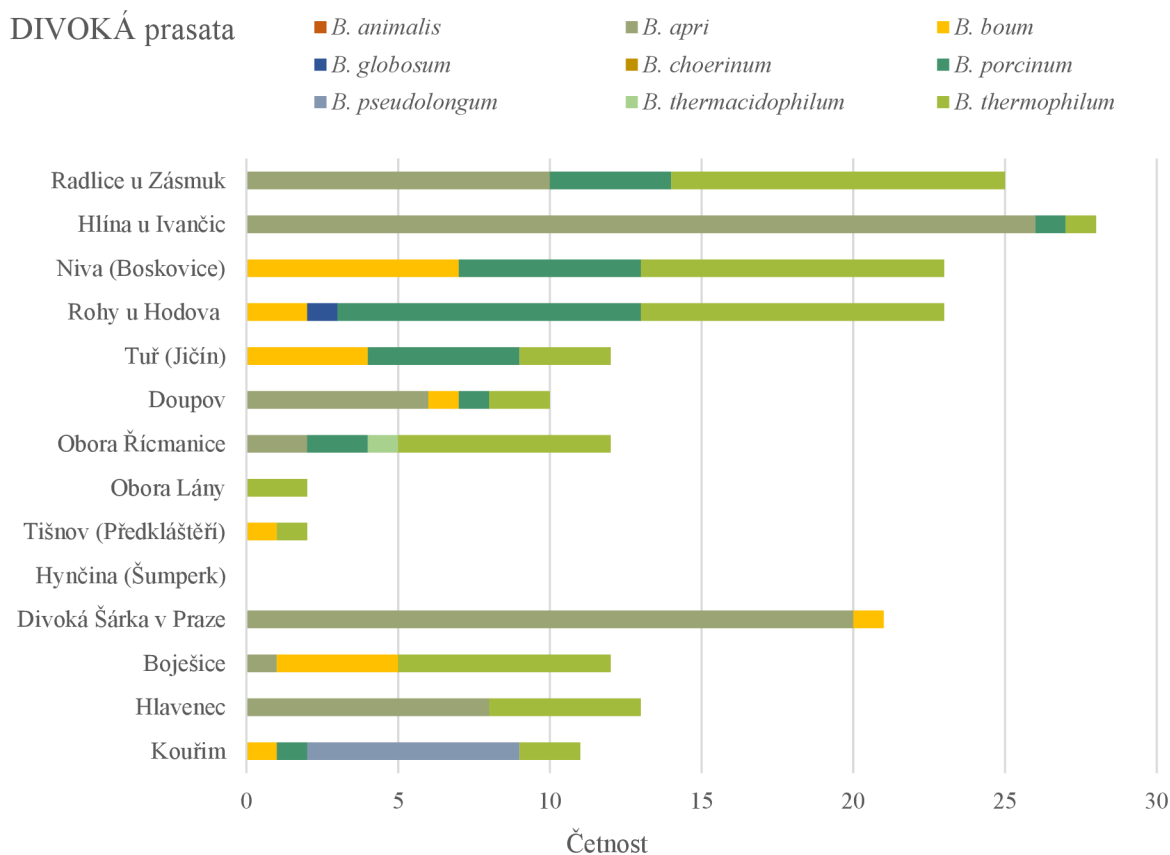
Detekované druhy bifidobakterií se lišily také v rámci lokalit. Sledovaní jedinci pocházeli z 19 odlišných lokalit v České republice. Jednotlivé oblasti divokých prasat a konkrétní farmy s domácími prasaty označuje **Obrázek 8**, který znázorňuje rozmístění všech lokalit v rámci ČR. Zastoupení sledovaných druhů bifidobakterií nesouviselo s lokalitami umístěnými blízko sebe, tudíž se nepotvrdila souvislost rozšíření bifidobakterií v rámci blízkých stanovišť.



Obrázek 8: Mapa České republiky se sledovanými lokalitami divokých a domácích prasat

Zastoupení druhů bifidobakterií v jednotlivých lokalitách pro divoká prasata zobrazuje **Graf 3**. V oblastech výskytu divokých prasat měli jedinci obecně nižší variabilitu druhů bifidobakterií, kdy u prasat z těchto lokalit byly detekovány nejvýše 4 různé druhy na jednu lokalitu. Jednalo se o Rohy u Hodova, Doupov (Karlovy Vary), Oboru Řícmanice a Kouřim. Některé druhy se vyskytly jen v jedné lokalitě. Pouze v oblasti Rohy u Hodova byl zjištěn druh *B. globosum*. *B. thermacidophilum* se vyskytl pouze v lokalitě Obory Řícmanice a *B. pseudolongum* byl u divokých prasat detekován pouze v oblasti Kouřimi, ve které tento druh převažoval (63,6 %). Nejvyšší počet *B. apri* byl u divokých prasat nalezen v obci Hlína u Ivančic (35,6 %) a následně v Divoké Šárce v Praze (27,4 %). Zároveň *B. apri* byl v těchto oblastech zastoupen téměř výhradně, i přestože jsou tyto dvě lokality od sebe dost vzdáleny. V obci Hlína u Ivančic jeho podíl činil 92,9 % a v Divoké Šárce dokonce 95,2 % ze všech sledovaných druhů v těchto oblastech u divokých prasat. Pro oblast Doupov (Karlovy Vary) byl *B. apri* také nejčastějším druhem (60,0 %), stejně jako pro Hlavenec (61,5 %). *B. boum* byl nejvíce detekován v lokalitě Niva (Boskovice) (33,3 %). Nejčastější výskyt druhu *B. porcimum* byl v oblasti Rohy u Hodova (33,3 %) v porovnání s oblastmi divokých prasat. Přičemž tato oblast byla pro tento druh typická i v porovnání se všemi sledovanými lokalitami (28,6 %). V Hynčíně (Šumperk) nebyly úspěšně detekovány žádné druhy.

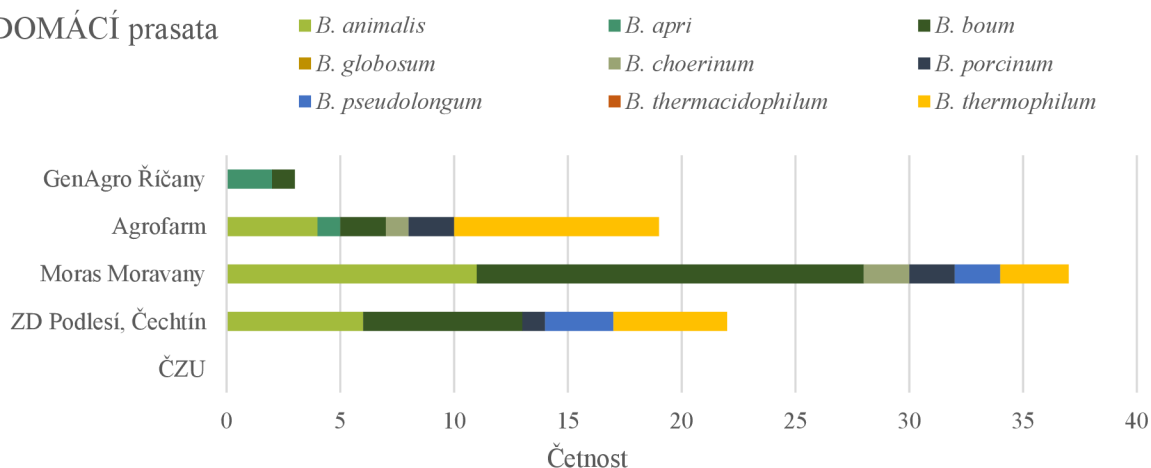
## DIVOKÁ prasata



Graf 3: Druhové zastoupení bifidobakterií v rámci sledovaných lokalit divokých prasat v ČR

Zastoupení detekovaných druhů bifidobakterií na farmách s domácími prasaty uvádí **Graf 4**. Na farmách byla detekována obecně vyšší variabilita druhů bifidobakterií. Konkrétně v zemědělském podniku Agrofarm (Žďár nad Sázavou) bylo u místních prasat nalezeno až 6 různých druhů bifidobakterií: *B. animalis*, *B. apri*, *B. boum*, *choerinum*, *B. porcinum*, a *B. thermophilum*. Taktéž tomu bylo na farmě Moras Moravany, kde byly detekovány druhy: *B. animalis*, *B. boum*, *choerinum*, *B. porcinum*, *B. pseudolongum* a *B. thermophilum*. Druh *B. animalis* byl zastoupen u domácích prasat převážně ze zemědělského podniku Moras Moravany (52,4 %) a následně ze Zemědělského družstva Podlesí (28,6 %). Druh *B. boum* byl z největší části zastoupen jen v Moras Moravany (63,0 %) a následně v ZD Podlesí (25,9 %) v porovnání s ostatními farmami. V porovnání se všemi sledovanými oblastmi jeho podíl v Moras Moravany činil 35,4 %. Z pohledu lokality Moras Moravany se zde v nejvyšším množství vyskytoval *B. boum* (46,0 %) a poté *B. animalis* (29,7 %). V podniku ZD Podlesí taktéž převažoval *B. boum* (31,8 %) a poté *B. animalis* (27,3 %). Na farmě GenAgro Říčany byly detekovány pouze dva druhy, konkrétně *B. apri* (66,7 %) a *B. boum* (33,3 %). V Agrofarm (Žďár nad Sázavou) převažoval *B. thermophilum* (47,4 %). Na České zemědělské univerzitě v Praze nebyly identifikovány žádné druhy bifidobakterií.

## DOMÁCÍ prasata



Graf 4: Druhové zastoupení bifidobakterií v rámci sledovaných lokalit domácích prasat v ČR

*B. thermophilum* byl nejvíce rozšířeným druhem, jelikož byl zastoupen v nejvíce námi sledovaných lokalitách ( $n = 15$ ) v poměrně vysokém podílu ve srovnání s ostatními druhy. Nejvíce byl identifikován z obce Radlice u Zásbuk (14,1 %), obce Niva (Boskovice) (12,8 %) a Rohy u Hodova (12,8 %). V poměrně vysokém množství byl také zastoupen u domácích prasat ze zemědělské společnosti Agrofarm (11,5 %), ve které byl jeho výskyt nejvyšší (47,4 %) v porovnání se zastoupenými druhy.

### ○ Vliv stáří hostitele na zastoupení bifidobakterií

Pro hodnocení vlivu stáří hostitele na zastoupení bifidobakterií byla použita dostupná data u 176 získaných izolátů z divokých prasat, pro která byla dostupná. Pro domácí prasata byla data nedostupná, tudíž vliv stáří hostitele pro tuto skupinu prasat nebyl hodnocen. Hostitelé byli rozdělení do 4 skupin: 1–2 měsíce, 3–7 měsíců, 8–10 měsíců a 20–36 měsíců. Stáří prasete hrálo rovněž svou roli v jednotlivém zastoupení druhů bifidobakterií. U skupiny selat starých 1–2 měsíce byl nejčastěji detekován druh *B. pseudolongum* (63,6 %), který se zároveň vyskytoval pouze u této věkové skupiny. U prasat ve věku 3–7 měsíců byl nejpočetnějším druhem *B. thermophilum* (37,2 %) následován *B. apri* (25,6 %). U starších prasat ve věku 8–10 měsíců byl izolován nejvyšší počet *B. apri* (47,4 %), stejně jako u věkové skupiny 20–36 měsíců (46,7 %). Druhy *B. boum*, *B. porcinum* a *B. thermophilum* se vyskytovaly u všech věkových skupin. **Tabulka 9** obsahuje zastoupení druhů bifidobakterií dle věkové skupiny prasat.

Tabulka 9: Druhové zastoupení bifidobakterií dle stáří divokých prasat

<b>DIVOKÁ prasata</b>				
<b>Druhy bifidobakterií</b>	<b>1–2 měsíce</b>	<b>3–7 měsíců</b>	<b>8–10 měsíců</b>	<b>20–36 měsíců</b>
<i>B. animalis</i>	-	-	-	-
<i>B. apri</i>	-	20	27	14
<i>B. boum</i>	1	12	2	1
<i>B. globosum</i>	-	-	-	1
<i>B. choerinum</i>	-	-	-	-
<i>B. porcinum</i>	1	17	7	5
<i>B. pseudolongum</i>	7	-	-	-
<i>B. thermacidophilum</i>	-	-	1	-
<i>B. thermophilum</i>	2	29	20	9
<b>Celkem</b>	<b>11</b>	<b>78</b>	<b>57</b>	<b>30</b>

○ **Vliv pohlaví hostitele na zastoupení bifidobakterií**

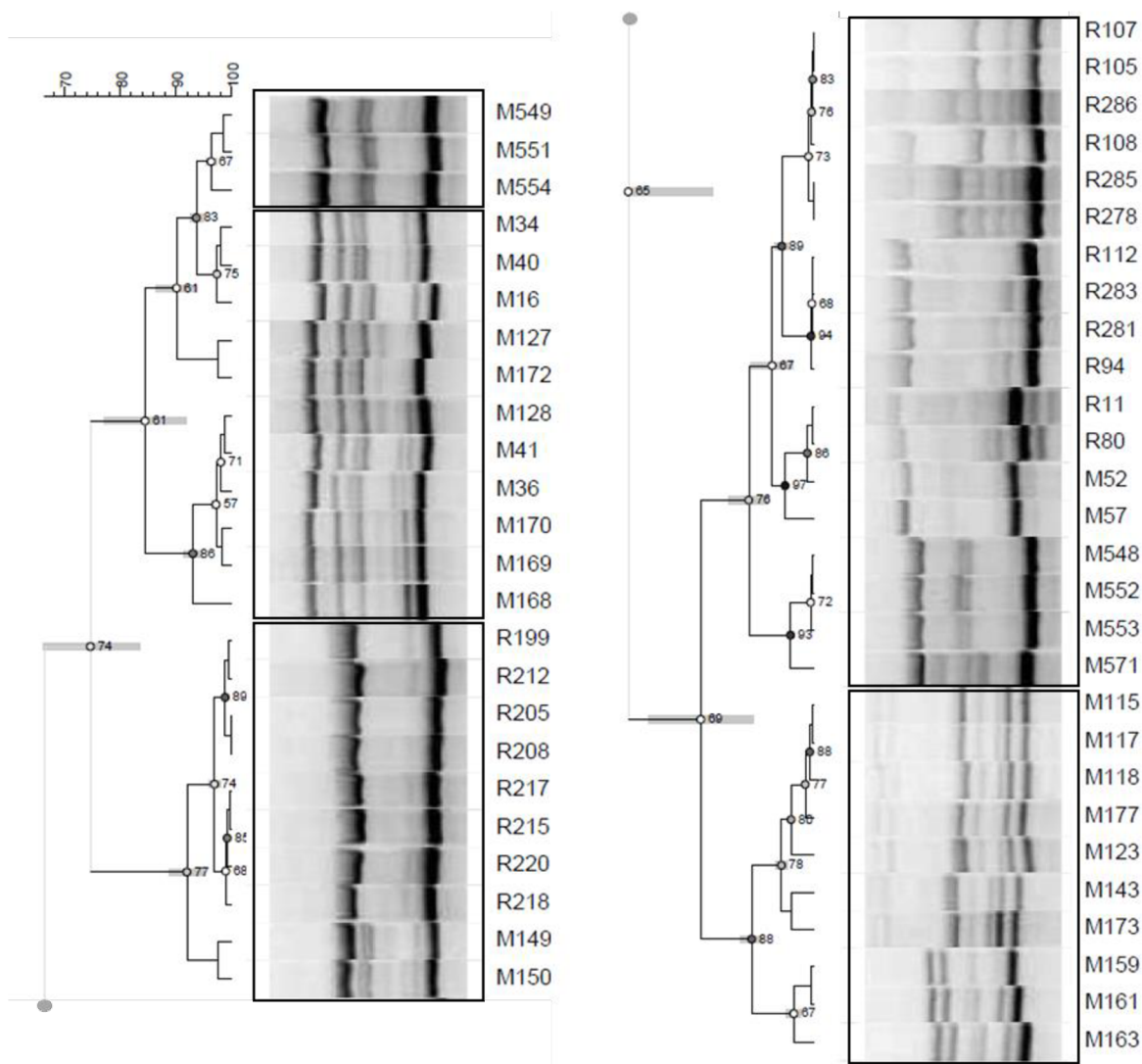
Pro hodnocení vlivu pohlaví hostitele na zastoupení bifidobakterií byla použita data u 257 bifidobakterií, pro která byla dostupná. Jednotlivý počet bifidobakterií u samic a samců ukazuje **Tabulka 10**. U divokých i domácích prasat měly samice vyšší zastoupení bifidobakterií než samci. Druhová variabilita byla u samic také vyšší než u samců. U samic prasat domácích byl izolován také druh *B. pseudolongum*, u samců nikoliv. Také byl u samic detekován vysoký počet *B. animalis* (39,5 %) na rozdíl od samců (10,5 %). Naopak u samců byl zjištěn vyšší podíl *B. boum* (57,9 %) než u samic (11,6 %). Samice divokých prasat měly nejvyšší zastoupení *B. apri* (36,8 %) a samci *B. thermophilum* (40,0 %). *B. thermophilum* byl u samic i samců prasečích hostitelů zastoupen v podobném procentuálním podílu.

Tabulka 10: Druhové zastoupení bifidobakterií v rámci pohlaví

<b>Druhy bifidobakterií</b>	<b>DOMÁCÍ</b>		<b>DIVOKÁ</b>	
	<b>Samice</b>	<b>Samci</b>	<b>Samice</b>	<b>Samci</b>
<i>B. animalis</i>	17	4	-	-
<i>B. apri</i>	1	2	39	22
<i>B. boum</i>	5	22	12	4
<i>B. globosum</i>	-	-	1	-
<i>B. choerinum</i>	2	1	-	-
<i>B. porcinum</i>	4	1	17	13
<i>B. pseudolongum</i>	5	-	4	3
<i>B. thermacidophilum</i>	-	-	1	-
<i>B. thermophilum</i>	9	8	32	28
<b>Celkem</b>	<b>43</b>	<b>38</b>	<b>106</b>	<b>70</b>

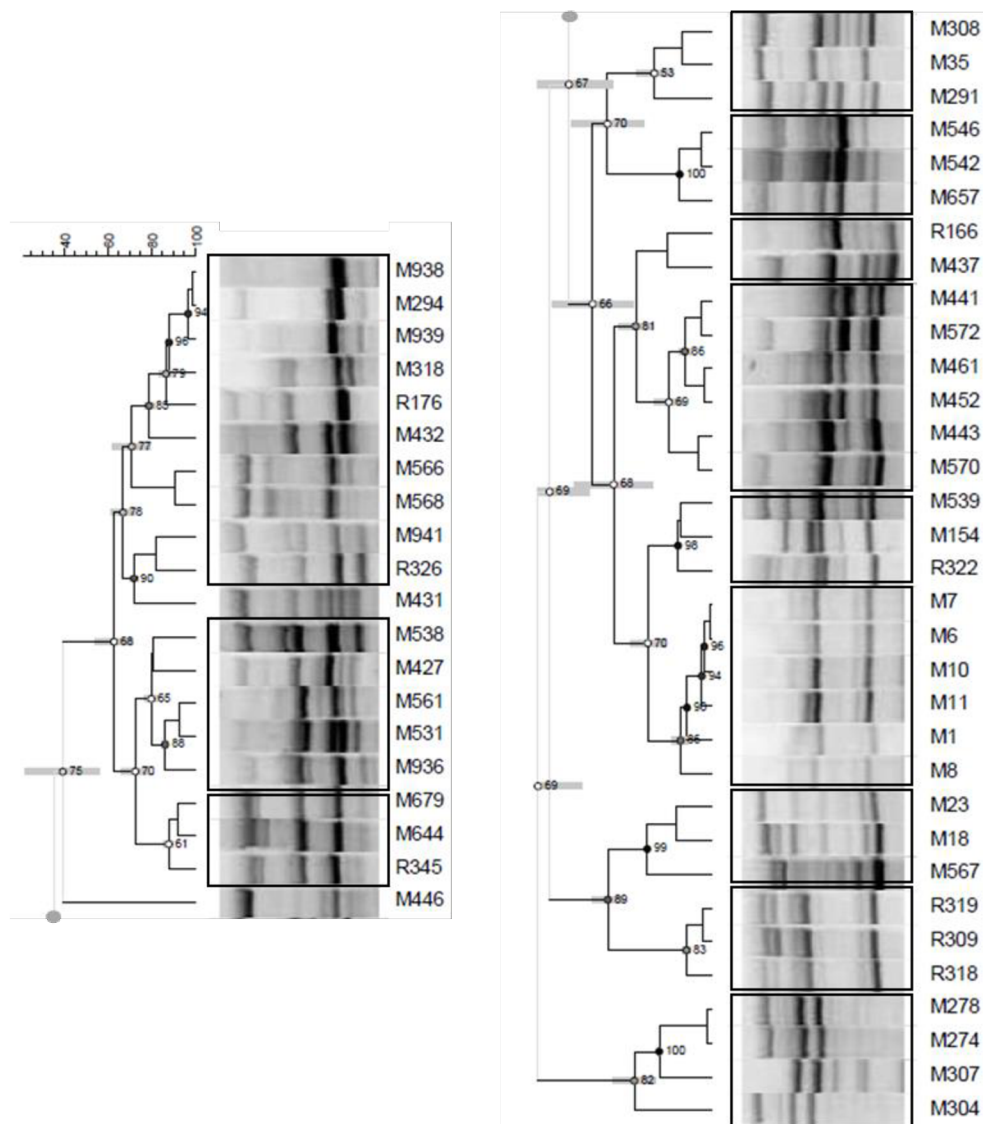
## 5.2 REP-PCR charakterizace

Na základě MALDI-TOF MS screeningu byly ve střevní mikrobiotě prasat jako nejčtenější druhy bifidobakterií detekovány *B. apri* a *B. thermophilum*, konkrétně u prasat divokých, a *B. animalis* a *B. boum* u prasat domácích. Pro zjištění jejich kmenové variability a možné potenciální přítomnosti také menších taxonomických celků byla u těchto čtyř druhů dále provedena fingerprintová metoda REP-PCR s použitím primeru GTG5. Pro charakterizaci v rámci druhu *B. apri* bylo vybráno 52 izolátů (**Obrázek 9**). Přestože všechny izoláty pocházely z mikrobioty divokých prasat, na základně shlukové analýzy došlo k jejich dílčímu rozdělení do pěti skupin s odlišnými profily.



Obrázek 9: Kmenová variabilita druhu *B. apri* s pěti odlišnými skupinami profilů získaných shlukovou analýzou

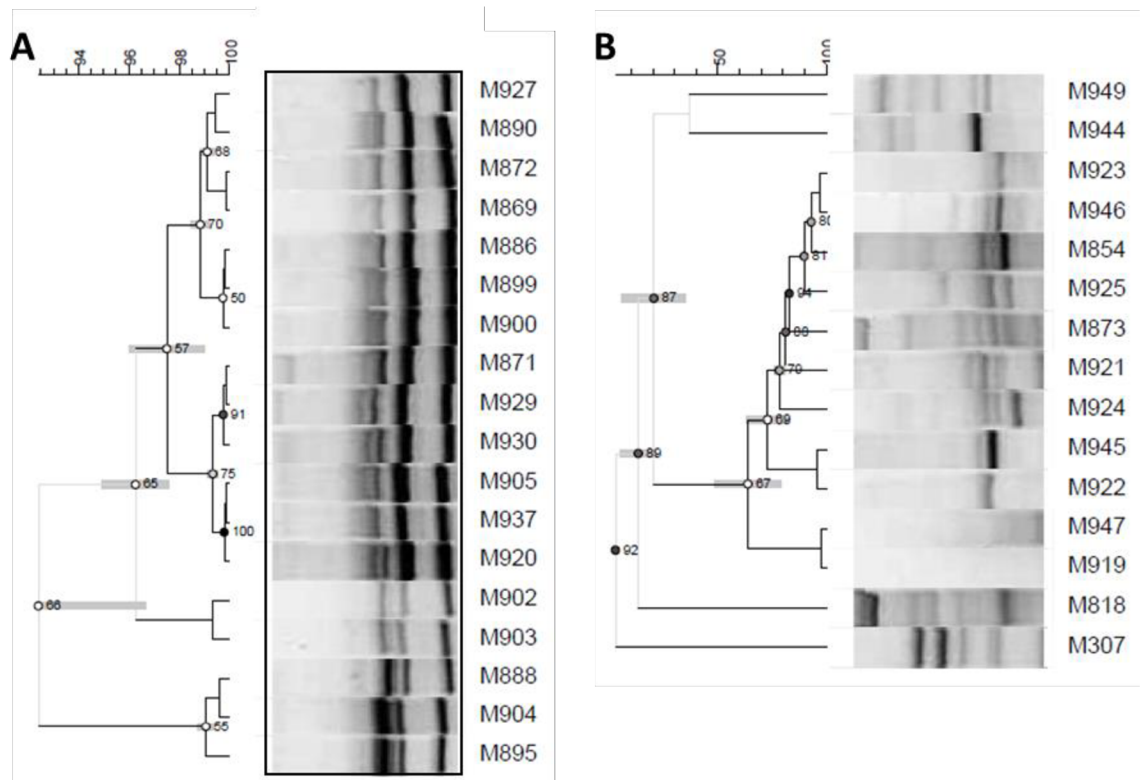
Stejnou metodou byly charakterizovány také izoláty v rámci druhu *B. thermophilum*. Celkově bylo vybráno 53 izolátů (**Obrázek 10**). V rámci tohoto druhu byl detekován podobný trend tvorby shluků jako u izolátů *B. apri*. Izoláty *B. thermophilum* vykazovaly významnou variabilitu umožňující jejich rozdělení do 12 dílčích skupin.



Obrázek 10: Kmenová variabilita druhu *B. thermophilum* s jedenácti odlišnými skupinami profilů získaných shlukovou analýzou

Také pro vybrané izoláty v rámci druhu *B. animalis* a *B. boum* byly vytvořeny fingerprintové profily. Celkově bylo vybráno 18 izolátů *B. animalis* (Obrázek 11; A) a 15 izolátů *B. boum* (Obrázek 11; B). Získané profily izolátů *B. animalis* byly v rámci detekovaných sub-skupin velmi podobné a lze tedy předpokládat pouze drobnou kmenovou variabilitu v rámci geneticky velmi podobných izolátů.





Obrázek 11: (A) Kmenová variabilita druhu *B. animalis*; (B) Kmenová variabilita druhu *B. boum*

Použitý primer GTG5 byl vhodným nástrojem pro fingerprintové profilování izolátů z druhů *B. apris*, *B. thermophilum* a *B. animalis*, nicméně nebyla potvrzena vhodnost jeho použití pro charakterizaci izolátů druhu *B. boum*. Výsledky pro tuto skupinu tedy nelze detailněji interpretovat (**Obrázek 11**; B) a pro budoucí charakterizace bude nezbytné zvolení jiného primeru.

## 6 Diskuze

Bifidobakterie představují jednu z velmi důležitých bakteriálních skupin v rámci kmene Actinobacteria (Michellini et al. 2016). Byly objeveny na počátku minulého století a jedná se o významné komenzální bakterie (Leahy et al. 2005). Jsou dobře známé příznivými účinky na zdraví svého hostitele, proto se běžně uplatňují jako probiotika v potravinách a krmivech (Leahy et al. 2005; Simpson et al. 2004a). Hrají nezastupitelnou roli v boji proti patogenům, stimulaci imunitního systému, vývoji střevní mikrobioty či v produkci enzymů spojených s trávením nestravitelných složek potravy (O'Callaghan & van Sinderen 2016). Také pozitivně ovlivňují kognitivní funkce (Savignac et al. 2015). Ačkoli nepředstavují jeden z dominantních rodů v gastrointestinálním traktu savců, zdá se, že jsou rozšířené a všudypřítomné u celé řady savčích hostitelů (Milani et al. 2017). Některé bifidobakterie mají kosmopolitní způsob života, zatímco jiné druhy zřejmě vykazují vysoce specializovanou ekologickou adaptaci na střevo svého hostitele (Turroni et al. 2011). Bifidobakterie byly izolovány také ze střeva prasat (Biavati & Mattarelli 2006). Zatímco v mikrobiotě prasat domácích převažují spíše laktobacily, u divokých prasat jsou bifidobakterie významně zastoupeny (Wei et al. 2022; Huang et al. 2020; Shang et al. 2022).

Cílem této práce bylo zidentifikovat izoláty bifidobakterií získané ze střevní mikrobioty divokých a domácích prasat metodou MALDI-TOF MS s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií. Celkem bylo zanalyzováno 584 divokých kmenů, které byly zařazeny do 9 různých druhů bifidobakterií: *B. animalis*, *B. apri*, *B. boum*, *B. globosum*, *B. choerinum*, *B. porcinum*, *B. pseudolongum*, *B. thermacidophilum* a *B. thermophilum*. Izoláty *B. thermophilum* a *B. apri* byly nejčtenější. Stejně druhy v mikrobiotě prasat byly detekovány již dříve, konkrétně *B. thermophilum* (Zani et al. 1974), *B. boum* (Mikkelsen et al. 2003), *B. apri* (Simpson et al. 2003), *B. pseudolongum* (Mitsuoka 1969) a *B. choerinum* (Scardovi et al. 1979). Nicméně byla popsána i detekce dalších druhů jako je *B. suis* (Matteuzzi et al. 1971), *B. suillum* (Yanokura et al. 2015), *B. psychraerophilum* (Simpson et al. 2004b) a *B. minimum* (Simpson et al. 2003), jejich přítomnost v naší kolekci nebyla potvrzena.

Divoká a domácí prasata se v rámci této práce značně lišila v zastoupení jednotlivých druhů bifidobakterií. U divokých prasat převažoval druh *B. apri* a následně *B. thermophilum*. Taktéž Pechar et al. (2017b) hojně izoloval druh *B. apri* z divokých prasat, spolu s vysokým zastoupením *B. thermophilum*, *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum* a v nižším počtu i *B. globosum*. V rámci našeho monitoringu druhového zastoupení bifidobakterií bylo dále zjištěno, že u domácích prasat byl nejčtenějším druhem *B. boum* a následně *B. animalis*, který u divokých prasat nebyl vůbec detekován. Detekovaný druh *B. choerinum* se taktéž vyskytoval pouze u domácích prasat. Naopak pouze u divokých prasat byly identifikovány druhy *B. globosum* a *B. thermacidophilum*. V dřívějších studiích byl u domácích prasat zjištěn vysoký výskyt *B. globosum*, *B. pseudolongum*, spolu s *B. thermophilum*, který převažoval (Gavini et al. 2006; Lamendella et al. 2008; Simpson et al. 2003). Je zajímavé, že naše výsledky poukazují na výskyt *B. boum* i *B. thermophilum* jak u domácích, tak u divokých prasat, což naznačuje jejich hostitelskou specifitu na prasečí mikrobiotu. To potvrzuje také Lamendella et al. (2008) v souvislosti s výskytem u domácích prasat. U divokých prasat poté Pechar et al. (2017b) také uvádí vysoké zastoupení *B. thermophilum* a Killer et al. (2013) *B. boum*.

Vzhledem k tomu, že *B. apri* byl poprvé izolován a popsán z trávicího traktu divokého prasete (Pechar et al. 2017b), naše výsledky také naznačují jeho hostitelskou specifitu. U divokých prasat představoval nejpočetnější bifidobakteriální druh. Je zajímavé, že v zanedbatelných počtech se vyskytl i u prasat domácích. Lze tedy předpokládat, že by to mohlo být způsobené společnou evoluční historií hostitele. Pechar et al. (2017b) navíc ještě dodává, že by mohl být předkem fylogenetické skupiny zahrnující termofilní druhy bifidobakterií u prasat (Pechar et al. 2017b). Detekované izoláty navíc vykazovaly vysokou kmenovou variabilitu, která naznačuje potenciální rozdělení tohoto druhu na více dílčích poddruhů. Podobně tomu bylo například také u druhu *B. longum*, u kterého bylo popsáno několik podruhů: *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *suus*, které byly naopak dříve samostatnými druhy (Sakata et al. 2002; Mattarelli et al. 2008). Posléze byl taktéž charakterizován *B. longum* subsp. *suillum* izolovaný z prasat (Yanokura et al. 2015). Zajímavé také je, že u divokých prasat druh *B. apri* výrazně dominoval v lokalitách Hlína u Ivančic a Divoká Šárka v Praze. Avšak souvislost rozšíření druhů v blízkých lokalitách se nepotvrdila. Detekován byl ve všech věkových skupinách u divokých prasat mimo selat starých 1–2 měsíce. U starších prasat ve věku 8–10 měsíců a 20–36 měsíců představoval nejpočetnější druh.

V rámci monitoringu druhového výskytu bifidobakterií u prasat byl jako druhý nejčastější druh u divokých prasat detekován *B. thermophilum*, který se ale hojně vyskytoval také u prasat domácích. Prvně ho popsal Mitsuoka (1969), který ho izoloval z výkalů prasat, kuřat, telat a z bachoru skotu (Mitsuoka 1969; Sgorbati et al. 1995). Dle Gavini et al. (2006) a Mayrhofer et al. (2007) tvoří *B. thermophilum* spolu s *B. pseudolongum* hlavní část bifidobakteriální mikrobioty ve střevech a výkalech skotu a prasat. Taktéž Ballesté & Blanch (2011) našli ve všech fekálních vzorcích domácích prasat druhy *B. thermophilum* spolu s *B. thermacidophilum* a Lamendella et al. (2008) druhy *B. thermophilum* a *B. boum*. Až Pechar et al. (2017b) našli *B. thermophilum* ve vysokém množství také u prasat divokých. V rámci této práce byla u tohoto druhu, stejně jako u *B. apri*, také detekována velmi vysoká kmenová variabilita. Z hlediska monitorovaných lokalit lze poté shrnout, že tento druh byl nejvíce rozšířeným. Byl zastoupen ve většině sledovaných oblastech. Zároveň se u divokých prasat vyskytoval ve všech věkových skupinách.

Třetím nejčastějším druhem bifidobakterií v mikrobiotě prasat a nejčastěji vyskytujícím se druhem u domácích prasat byl *B. boum*. Původně byl izolován z bachoru skotu a výkalů prasat (Scardovi et al. 1979). Tento druh byl nalezen u selat z komerčního chovu (Maxwell et al. 2004; Mikkelsen et al. 2003) a taktéž u prasat divokých (Killer et al. 2013). Mikkelsen et al. (2003) dokonce naznačují specifitu tohoto druhu pro prasečího hostitele. To potvrzuje také Lamendella et al. (2008), kteří tento druh izolovali ve vysokém počtu z prasečích výkalů na farmách. Naše výsledky potvrzují předchozí zjištění. *B. boum* se totiž vyskytoval u divokých i domácích prasat s nejčastějším zastoupením u prasat domácích. Je zajímavé, že v rámci této práce byl nejčastěji detekován na farmě Moras Moravany, kde jeho podíl ve srovnání s ostatními oblastmi výrazně převažoval. Tento druh se také vyskytoval u všech věkových skupin divokých prasat.

Dalším významně zastoupeným druhem bifidobakterie byl také *B. animalis*, druhý nejčastěji detekovaný druh u domácích prasat. Původně byl izolován z výkalů krys (Mitsuoka 1969), avšak jako samostatný druh byl uznán až posléze, kdy došlo k odlišení dvou poddruhů

*B. animalis* subsp. *lactis* a *B. animalis* subsp. *animalis* (Masco et al. 2004). Tento druh žije kosmopolitním způsobem života, což podtrhuje jeho potenciální vysokou genetickou adaptaci na různá hostitelská prostředí (Lugli et al. 2019a). Je zajímavé, že v této práci byl *B. animalis* identifikován jen u domácích prasat. Jelikož se jedná o typicky multihostitelský druh, mohl se do střeva prasat dostat několika různými způsoby. Nejpravděpodobněji došlo k jeho rozšíření mezi hospodářskými zvířaty chovanými na farmách, jak naznačují i Rodriguez et al. (2017) a Pechar et al. (2017b). Také se do gastrointestinálního traktu domácích prasat mohl dostat probiotickou intervencí. Poddruh *B. animalis* subsp. *lactis* je totiž nejčastěji používanou probiotickou bifidobakterií v mléčných výrobcích (Masco et al. 2005), které jsou běžně podávány i domácím prasatům. To potvrzuje i jeho výskyt převážně na farmě Moras Moravany a také fakt, že z hlediska kmenové variability se pravděpodobně jedná o stejný kmen bifidobakterie.

Jako minoritněji zastoupenými druhy v mikrobiotě prasat byly v této práci detekovány druhy *B. porcinum*, *B. pseudolongum*, *B. globosum*, *B. choerinum* a *B. thermacidophilum*. Již dříve byly také tyto druhy ve střevní mikrobiotě prasat detekovány. Konkrétně *B. porcinum* byl původně izolován z výkalů domácích prasat (Zhu et al. 2003), ale byl detekován i u prasat divokých (Pechar et al. 2017b), což naše výsledky taktéž potvrdily. Zatímco druh *B. globosum* může být adaptován na různé ekologické niky (Lugli et al. 2019a), avšak v nižším počtu byl již také detekován u divokých prasat (Pechar et al. 2017b). Také *B. pseudolongum* byl již dříve izolován ze střev prasat a je zřejmě více specializován na určité hostitele (Gavini et al. 2006; Lugli et al. 2019a). Je zajímavé, že Zani et al. (1974) dokonce izolovali druhy *B. globosum* a *B. pseudolongum* z téměř poloviny vzorků prasečích výkalů získaných z farem. Také námi detekovaný druh *B. choerinum* u prasat domácích, byl originálně izolován z výkalů selat (Scardovi et al. 1979). Dle Maxwell et al. (2004) se totiž jedná o autochtonní druh bifidobakterie u prasat, který je dobře adaptován na střevo selat před jejich odstavením. S prasečím hostitelem byl již dříve spojen také námi identifikovaný druh *B. thermacidophilum* (Mølbak et al. 2007; Kim et al. 2007), přestože byl originálně izolován z anaerobního fermentoru pro čištění odpadních vod (Dong et al. 2000). Marti et al. (2009) navíc prokázali, že *B. thermacidophilum* je pro prasata specifická bifidobakterie, a proto by mohla být použita jako specifický marker pro detekci kontaminace výkaly prasat.

Naše výsledky dále naznačují, že kromě rozdělení prasat na domácí a divoká, také lokalita života či chovu ovlivňovala druhové zastoupení bifidobakterií. Na jednotlivých farmách s domácími prasaty byla vyšší variabilita druhů bifidobakterií než v oblastech divokých prasat. Například v podniku Agrofarm a Moras Moravany bylo u obou oblastí detekováno až 6 různých druhů. V lokalitách volné přírody byly nalezeny nanejvýš 4 odlišné druhy na lokalitu. To je v souladu se studiemi, které uvádí, že domácí prasata z farem vykazují obecně vysokou druhovou diverzitu (Bunesova et al. 2014; Pechar et al. 2017a). Také Milani et al. (2017) odhalili vyšší biodiverzitu bifidobakterií u domestikovaných druhů na farmách ve srovnání s volně žijícími zvířaty. Přičítají to časté interakci s lidmi a domestikovanému způsobu života, které napomáhají zisku dalších bifidobakteriálních taxonů savci. Také pohlaví hostitele zřejmě ovlivňuje výskyt druhů. U obou skupin prasat měly samice vyšší zastoupení bifidobakterií než samci a zároveň vykazovaly vyšší druhovou variabilitu, kdy u nich bylo zastoupeno 7 různých druhů. Variabilnější druhové zastoupení u samic by mohlo být spojeno s úzkým kontaktem s mláďaty a kojením. Tudíž by mohlo být

pro samice typické vyšší a variabilnější zastoupení bifidobakterií. Dle Duranti et al. (2020) bylo prokázáno, že bifidobakterie se mohou zapojit do vertikálního přenosu, ke kterému dochází mezi matkou a novorozencem během porodu a pravděpodobně i následným kojením. Tento fascinující jev se vyskytuje nejen u lidí, ale také u jiných druhů savců. Milani et al. (2017) naznačují rozsáhlý přenos střevních bifidobakteriálních druhů z matky na mládě mezi zástupci savců. Zároveň zdůrazňují klíčovou roli vertikálního přenosu při určování biodiverzity a složení bifidobakteriální populace kolonizující střevo mláděte.

Na základě získaných výsledků lze shrnout, že metoda MALDI-TOF MS s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií se v této práci potvrdila jako vhodný nástroj pro rozlišení velkého množství variabilních druhů bifidobakterií izolovaných z prasečího hostitele. Mezi výhody MALDI-TOF MS obecně patří její jednoduchost, velmi vysoká citlivost, přesnost, reprodukovatelnost a rychlost (Kowalczyk-Akimowicz & Bucka-Kolendo 2020). Zároveň lze databázi referenčních spekter měnit a upravovat (Wieser et al. 2012). Právě díky dřívějšímu rozšíření databáze o nové druhy bifidobakterií (Modráčková et al. 2021) bylo možné v našich testovaných izolátech detekovat také další druhy, jako například *B. apri* či *B. porcimum*, které by jinak nebylo možné touto metodou identifikovat, neboť se v klasické Bruker databázi nevyskytují. Brodzik et al. (2016) i Ashfaq et al. (2022) dodávají, že dostupný rozsah databáze referenčních spekter mikroorganismů určuje spolehlivost následné MALDI-TOF MS. Vytvoření specializované interní knihovny obsahující spektra referenčních kmenů a izolátů, které jsou předmětem zájmu, tak může zlepšit přesnost identifikace na úrovni druhů, a v některých případech i poddruhů, doplňuje Mohar Lorbeg et al. (2021). V rámci této práce bylo úspěšně identifikováno na úroveň druhu 50,5 % a na úroveň rodu dokonce 80,1 %. Nemožnost identifikace zbylého podílu kmenů mohlo být způsobeno chybějícími spektry některých bifidobakteriálních druhů v databázi či možnostmi technických chyb. To potvrzuje také Ciešlik & Wroblewska (2019). Kvalita spektra totiž může být ovlivněna několika faktory. Konkrétně podmínkami kultivace (Carbonnelle et al. 2011), množstvím bakteriálních buněk, extrakcí vzorku, skladováním nebo typem použité matrice (Fenselau 2013). V případě anaerobních bakterií může být kvalita spektra ovlivněna dokonce i vystavením bakteriálních buněk kyslíku (Veloo et al. 2014). Mohar Lorbeg et al. (2021) zároveň uvádí, že přestože v jejich případě bylo mnoho izolátů detekováno v rozmezí skóre 1,700–1,999, a bylo tedy příliš nízké pro přesnou identifikaci druhu dle výrobce, většina těchto získaných výsledků byla potvrzena pomocí PCR na druhové úrovni. To signalizuje, že obecná kritéria pro interpretaci výsledků MALDI-TOF MS by mohla být v případě bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií příliš přísná, a i hodnoty skóre <2,00 mohou spolehlivě indikovat daný druh. Pro přesnou a správnou identifikaci je nicméně nezbytné kombinovat MALDI-TOF MS i s dalšími metodami.

Výsledky MALDI-TOF MS identifikace však nelze vždy považovat za spolehlivé, a to konkrétně na úrovni některých druhů a poddruhů (Dušková et al. 2012). Už i kmeny v rámci jednoho druhu totiž bývají velmi podobné z hlediska genotypu i fenotypu (Sandrin et al. 2012). Příkladem by mohly být *B. thermophilum* a *B. thermacidophilum*, které jsou metodou MALDI-TOF MS obtížně rozlišitelné (Von Ah et al. 2007). Obě kopie totožného vzorku vykazovaly vysoké skóre při identifikaci obou druhů s vysokou mírou jistoty. Tyto druhy jsou si totiž blízce příbuzné a mohly by být dokonce v budoucnu překlasifikovány na stejný druh, uvádí Von Ah et al. (2007). To potvrzují i Pechar et al. (2017a) a Marti et al. (2009).

MALDI-TOF MS detekuje některé mikroorganismy s vysokou fylogenetickou příbuzností velmi obtížně (Ciešlik & Wroblewska 2019). Modrackova et al. (2021) toto potvrzují a konkrétně uvádějí některé uměle vytvořené identifikační skupiny, například *B. catenulatum/B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum/merycicum*, *B. imperatoris/saguini* a *B. breve/indicum*, pro bifidobakteriální druhy, které metodou MALDI-TOF MS nelze spolehlivě odlišit. Proto je nezbytné zapojení ještě dalších metod pro jejich přesnější druhové odlišení. I z tohoto důvodu je například doporučováno pro rozlišení blízce příbuzných druhů použití MALDI-TOF MS v kombinaci s genotypovými technikami (Dušková et al. 2012). Wieser et al. (2012) to potvrzují a dodávají, že pokud se druhy dostatečně neliší v sekvencích ribozomálních proteinů, je nutné použít klasické biochemické testy, detekci antigenů či genotypové metody. Mohar Lorbeg et al. (2021) uvádí, že PCR identifikace stále nabízí výhodu oproti MALDI-TOF MS analýze ve schopnosti přesné identifikace druhu i poddruhu bez nutnosti jejich kultivace.

Dalším cílem této práce tedy byla i genotypová charakterizace vybraných izolátů fingerprintovou metodou REP-PCR s použitím primeru GTG<sub>5</sub>. Kmenová variabilita byla určena u nejčtenějších druhů divokých prasat: *B. apri* a *B. thermophilum* a nejčtenějších druhů domácích prasat: *B. animalis* a *B. boum*. Každá dílčí skupina by pravděpodobně mohla znamenat i nový poddruh či druh, který MALDI-TOF MS nebyla schopna od jiného rozlišit díky jeho vysoké fylogenetické příbuznosti (Ciešlik & Wroblewska 2019; Duškové et al. 2012). Příkladem by mohl být i druh *B. pseudolongum*, který byl dříve dělen na dva poddruhy, nicméně dnes jsou považovány za dva odlišné druhy (Lugli et al. 2019b). MALDI-TOF MS spektra těchto druhů by tedy mohla být velmi podobná. Zároveň by se ale také mohlo jednat o vysokou kmenovou variabilitu v rámci hostitele. Například v rámci této práce došlo u druhu *B. apri* k jeho rozdělení do 5 odlišných skupin pomocí shlukové analýzy. První skupina zahrnovala kmeny izolované pouze od samců divokých prasat 6 měsíců starých z lokality Doupov (Karlovy Vary). Tyto kmeny byly tudíž specifické pro konkrétního hostitele a lokalitu. Podobnost kmenů v páté skupině divokých prasat by také mohla souviset s lokalitou, jelikož všechny kmeny pocházely z Hlíny u Ivančic. Dále je zajímavé, že u *B. thermophilum* byla patrná vysoká kmenová variabilita, kdy u tohoto druhu bylo nalezeno dokonce 12 odlišných skupin. Tyto výsledky proto naznačují možnou nedostatečnost MALDI-TOF MS pro odlišení druhů v rámci této fylogenetické skupiny. Dle Alessandri et al. (2021) *B. thermophilum* totiž patří do fylogenetické skupiny *B. boum*, spolu s druhy *B. porcinum*, *B. thermacidophilum*, *B. apri* a *B. boum*. Zatímco profily izolátů *B. animalis* u domácích prasat se zdály velmi podobné, proto lze předpokládat jen drobnou kmenovou variabilitu v rámci tohoto druhu. Zároveň se jedná o geneticky velmi obdobné jednice, i přes to, že pocházeli z odlišných lokalit. Již dříve Bunesova et al. (2017) zjišťovali variabilitu kmenů poddruhu *B. animalis* subsp. *lactis* a s pár výjimkami se tyto kmeny téměř shodovaly. Vykazovaly blízkou příbuznost a vysokou genetickou podobnost v rámci různého prostředí. Přestože se použitý primer GTG<sub>5</sub> osvědčil jako vhodný pro získání fingerprintových profilů většiny sledovaných izolátů, pro kmeny z druhu *B. boum* nebyl vhodný. I z tohoto důvodu by do budoucna bylo vhodné pro fingerprintovou analýzu použít i jiné primery, jako jsou například primer 103, 173 (Sakata et al. 2002), OPR13, OPV07, OPV08 (Mayer et al. 2007), BOX1AR (Masco et al. 2003), P17 (Samarzija et al. 2002) či PER1 (Pérez et al. 2002). Křížová et al. (2008) i Masco et al. (2003) zdůrazňují vhodnost primeru BOXA1R pro

bifidobakterie. Nicméně pro získání komplexních a přesných informací pro daný izolát až na úroveň kmenu by poté bylo žádoucí kombinovat více metod, jako je například sekvenace genu 16S rRNA (Böhme et al. 2012), multilocus sequence typing (Delétoile et al. 2010) či celogenomové sekvenování (Kwong et al. 2015). Do budoucna budou na základě získaných výsledků vybrány vhodné izoláty pro detailnější charakterizace a další testování.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo zpracovat literární rešerši na základě aktuálních vědeckých poznatků o rodu *Bifidobacterium* v souvislosti se střevní mikrobiotou *Sus scrofa*. Dále bylo cílem identifikovat izoláty bifidobakterií ze sbírky divokých kmenů získaných ze střevní mikrobioty divokých a domácích prasat pomocí MALDI-TOF MS a v neposlední řadě vybrané izoláty charakterizovat pomocí REP-PCR. Všechny cíle této diplomové práce byly splněny. Hypotézou byl předpoklad vlivu prostředí (volná příroda, lokalita a chov), ve kterém žijí jedinci *Sus scrofa*, na ovlivnění druhového zastoupení bifidobakterií v jejich střevní mikrobiotě. Druhové zastoupení bifidobakterií se u divokých a domácích prasat značně lišilo. Zastoupení jistých druhů bylo typické pro jednu skupinu prasat či určitou lokalitu, zároveň však některé druhy byly rozšířeny jak na farmách, tak i ve volné přírodě. Hypotéza tedy byla potvrzena pouze částečně.

Celkem bylo identifikováno 584 divokých kmenů bifidobakterií, z nichž se metodou MALDI-TOF MS s rozšířenou databází pro identifikaci bifidobakterií podařilo úspěšně identifikovat 50,5 % izolátů na úroveň druhu a 80,1 % na úroveň rodu. Tato metoda se tedy osvědčila jako vhodný nástroj pro screening druhového zastoupení bifidobakterií pocházejících ze střevní mikrobioty prasat. Celkem bylo identifikováno 9 různých druhů bifidobakterií. Nejčastěji detekovaným druhem u prasečího hostitele byl *B. thermophilum* a následně *B. apri*. U divokých prasat byl nejčetnějším druhem *B. apri*, zatímco u domácích *B. boum* s druhým nejčetnějším druhem *B. animalis*, jež navíc u divokých prasat nebyl detekován. Obecně lze shrnout, že *B. apri* je zřejmě hostitelsky specifickým druhem pro divoká prasata a že druhy *B. boum*, *B. thermophilum* a *B. porcinum* se běžně vyskytují ve střevní mikrobiotě jak divokých, tak domácích prasat.

Z hlediska rozdílnosti v rámci druhu byla vysoká kmenová variabilita zjištěna u *B. thermophilum* a *B. apri* izolovaných z divokých prasat, zatímco nejnižší variabilitu vykazoval *B. animalis* u prasat domácích s geneticky podobnými kmeny napříč lokalitami. Použitý primer GTG<sub>5</sub> se ukázal jako vhodný nástroj pro charakterizaci bifidobakterií s výjimkou druhu *B. boum*.



## 8 Literatura

- Alessandri G, Sinderen D van, Ventura M. 2021. The genus *Bifidobacterium*: from genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **19**:1472–1487.
- Al-Rubea FM, Mohammed RAK, Barrak MM, Aboob AJ. 2021. Molecular Detection Of *Bifidobacterium* Dentium From Patients With Tooth Caries. *Natural Volatiles and Essential Oils* **8**:5423–5430.
- Anhalt JP, Fenselau Catherine. 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **47**:219–225.
- Ashfaq MY, Da'na DA, Al-Ghouthi MA. 2022. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. *Journal of Environmental Management* **305**:1–24.
- Ballesté E, Blanch AR. 2011. Bifidobacterial Diversity and the Development of New Microbial Source Tracking Indicators. *Applied and Environmental Microbiology* **77**:3518–3525.
- Barba-Vidal E, Martín-Orúe SM, Castillejos L. 2019. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. *Livestock Science* **223**:84–96.
- Barberis C, Cittadini R, Almuzara M, Feinsilberg A, Famiglietti A, Ramirez M, Vay C. 2011. Recurrent Urinary Infection with *Bifidobacterium scardovii*. *Journal of clinical microbiology* **50**:1086–1088.
- Biavati B, Mattarelli P. 2006. The Family *Bifidobacteriaceae*. *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer, New York.
- Biavati B, Mattarelli P. 2009. Genus *Bifidobacterium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **5**:171–206.
- Biavati B, Mattarelli P. 2015. *Bifidobacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Biavati B, Mattarelli P. 2018. Related Genera Within the Family *Bifidobacteriaceae*. *The Bifidobacteria and Related Organisms*.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* **50**:117–131.
- Bizzini A, Greub G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:1614–1619.
- Bochner BR. 2009. Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS microbiology reviews* **33**:191–205.
- Bogere P, Choi YJ, Heo J. 2019. Probiotics as alternatives to antibiotics in treating post-weaning diarrhoea in pigs: Review paper. *South African Journal Of Animal Science* **49**:403–416.
- Böhme K et al. 2012. Species Identification of Food Spoilage and Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF Mass Fingerprinting. *Page Food Quality*. IntechOpen.
- Bottacini F et al. 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PloS One* **7**:1–14.
- Bottacini F, van Sinderen D, Ventura M. 2017. Omics of bifidobacteria: research and insights into their health-promoting activities. *The Biochemical Journal* **474**:4137–4152.

- Breed RS, Murray EGD, Smith NR. 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th Edition. Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Brodzik C, Augustynowicz E, Korzeniowska-Kowal A, Lutyhska A. 2016. Application of the MALDI-TOF for identification of *Clostridium perfringens* strains. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia* **68**:13–21.
- Buchanan RE, Bergey DH, Gibbons NE. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th edition. Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Bunesova V, Killer J, Javurková B, Vlková E, Tejnecký V, Musilová Š, Rada V. 2017. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Anaerobe* **44**:40–47.
- Bunesova V, Vlková E, Rada V, Killer J, Musilová Š. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: Differences and similarities. *Beneficial microbes* **5**:1–12.
- Cao H, Yang X, Peng C, Wang Y, Guo Q, Su H. 2022. Gut microbiota reveals the environmental adaption in gastrointestinal tract of wild boar in karst region of Southwest China. *Annals of Microbiology* **72**:1–15.
- Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J-L, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* **44**:104–109.
- Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. 2016. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* **59**:678–690.
- Chang SY, Belal SA, Kang DR, Il Choi Y, Kim YH, Choe HS, Heo JY, Shim KS. 2018. Influence of Probiotics-Friendly Pig Production on Meat Quality and Physicochemical Characteristics. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **38**:403–416.
- Chen C, Zhou Y, Fu H, Xiong X, Fang S, Jiang H, Wu J, Yang H, Gao J, Huang L. 2021. Expanded catalog of microbial genes and metagenome-assembled genomes from the pig gut microbiome. *Nature Communications* **12**.
- Ciešlik J, Wroblewska M. 2019. MALDI TOF MS – new possibilities in routine microbiological diagnostics. *Diagnostyka Laboratoryjna* **54**:99–104.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:547–603.
- Correa-Fiz F et al. 2019. Comparative analysis of the fecal microbiota from different species of domesticated and wild suids. *Scientific Reports* **9**:1–15.
- Delétoile A, Passet V, Aires J, Chambaud I, Butel M-J, Smokvina T, Brisse S. 2010. Species delineation and clonal diversity in four *Bifidobacterium* species as revealed by multilocus sequencing. *Research in Microbiology* **161**:82–90.
- Demnerová K. 2012. Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní ochranu. *Chemické listy* **106**:920–925.
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:119–125.
- Duranti S, Longhi G, Ventura M, van Sinderen D, Turrone F. 2020. Exploring the Ecology of Bifidobacteria and Their Genetic Adaptation to the Mammalian Gut. *Microorganisms* **9**:1–18.
- Duškova M, Šedo O, Kšicová K, Zdráhal Z, Karpíšková R. 2012. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology* **159**:107–114.

- Elderman M, Hugenholtz F, Belzer C, Boekschoten M, van Beek A, de Haan B, Savelkoul H, de Vos P, Faas M. 2018. Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. *Biology of Sex Differences* **9**:1–18.
- Fenselau CC. 2013. Rapid Characterization of Microorganisms by Mass Spectrometry. What Can Be Learned and How? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **24**:1161–1166.
- Friedecký B, Lemr K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus. České společnosti klinické biochemie* **20**:152–157.
- Gavini F, Delcenserie V, Kopeinig K, Pollinger S, Beerens H, Bonaparte C, Upmann M. 2006. *Bifidobacterium* Species Isolated from Animal Feces and from Beef and Pork Meat. *Journal of food protection* **69**:871–877.
- Gevers D, Huys G, Swings J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* **205**:31–36.
- Gibson GR. 2008. Prebiotics as Gut Microflora Management Tools. *Journal of Clinical Gastroenterology* **42**:75–79.
- Gibson GR et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* **14**:491–502.
- Hayashi H, Shibata K, Sakamoto M, Tomita S, Benno Y. 2007. *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *Microbiology Society*.
- Hill C et al. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **11**:506–514.
- Hoyles L, Inganäs E, Falsen E, Drancourt M, Weiss N, McCartney AL, Collins MD. 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Microbiology Society*.
- Huang J, Zhang W, Fan R, Liu Z, Huang T, Li J, Du T, Xiong T. 2020. Composition and functional diversity of fecal bacterial community of wild boar, commercial pig and domestic native pig as revealed by 16S rRNA gene sequencing. *Archives of Microbiology* **202**:843–857.
- Hugerth LW, Andersson AF. 2017. Analysing Microbial Community Composition through Amplicon Sequencing: From Sampling to Hypothesis Testing. *Frontiers in Microbiology* **8**:1–22.
- Hungate RE, Macy J. 1973. The Roll-Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Bulletins from the Ecological Research Committee* **17**:123–126.
- Ikeda-Ohtsubo W, Brugman S, Warden CH, Rebel JMJ, Folkerts G, Pieterse CMJ. 2018. How Can We Define “Optimal Microbiota”? A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. *Frontiers in Nutrition* **5**:1–18.
- Jian W, Zhu L, Dong X. 2001. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:1633–1638.
- Kadlčík V, Kodíček M, Hassman M. 2002. Využití hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF pro studium prostorové struktury proteinů. *Chemické listy* **7**:618–623.
- Kawasaki S, Mimura T, Sato T, Takeda K, Niimura Y. 2006. Response of the Microaerophilic *Bifidobacterium* Species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to Oxygen. *Applied and environmental microbiology* **72**:6854–6858.

- Killer J, Kopecny J, Mrázek J, Havlík J, Koppová I, Benada O, Rada V, Kofroňová O. 2010. *Bombiscardovia coagulans* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of bumblebees. *Systematic and applied microbiology* **33**:359–66.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunesova V, Mrazek J, Vlková E. 2018a. Gene encoding the CTP synthetase as an appropriate molecular tool for identification and phylogenetic study of the family *Bifidobacteriaceae*. *Microbiology Open* **7**:1–11.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunesova V, Vlková E. 2018b. The threonine-tRNA ligase gene region is applicable in classification, typing, and phylogenetic analysis of bifidobacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* **56**:713–721.
- Killer J, Mrázek J, Bunesova V, Havlík J, Koppová I, Benada O, Rada V, Kopecný J, Vlková E. 2013. *Pseudoscardovia suis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*). *Systematic and Applied Microbiology* **36**:11–16.
- Kim HB, Isaacson RE. 2015. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary Microbiology* **177**:242–251.
- Kim PI, Jung MY, Chang Y-H, Kim S, Kim S-J, Park Y-H. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**:1103–1111.
- Klose V, Bayer K, Bruckbeck R, Schatzmayr G, Loibner A-P. 2010. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Veterinary Microbiology* **144**:515–521.
- Kostic A, Howitt M, Garrett W. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & development* **27**:701–718.
- Koubková L, Vyzula R, Vojtěšek B. 2014. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice*.
- Kowalczyk-Akimowicz M, Bucka-Kolendo J. 2020. MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta biochimica Polonica* **67**:327–332.
- Křížová J, Španová A, Rittich B. 2008. RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia Microbiologica* **53**:99–104.
- Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology* **47**:199–210.
- Ladero V, Sánchez B. 2017. Molecular and technological insights into the aerotolerance of anaerobic probiotics: examples from bifidobacteria. *Current Opinion in Food Science* **14**:110–115.
- Lalles J-P, Boudry G, Favier C, Floc'h N, Le Huërou-Luron I, Montagne L, Oswald I, Pié S, Piel C, Sève B. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: *Physiology* **53**:301–316.
- Lamendella R, Domingo JWS, Kelty C, Oerther DB. 2008. Bifidobacteria in Feces and Environmental Waters. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:575–584.
- Lamendella R, Santo Domingo JW, Ghosh S, Martinson J, Oerther DB. 2011. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology* **11**:1–17.
- Larson G et al. 2005. Worldwide Phylogeography of Wild Boar Reveals Multiple Centers of Pig Domestication. *Science (New York)* **307**:1618–1621.

- Lay JO. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* **20**:172–194.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1303–1315.
- Lee J, Shin Y, Kim K. 2014. Screening of Bifidobacteria for the Development of Probiotics Inhibiting Intestinal Pathogenic Bacteria. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. 2006. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* **124**:837–848.
- Liao SF, Nyachoti M. 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition* **3**:331–343.
- Loh G, Eberhard M, Brunner RM, Hennig U, Kuhla S, Kleessen B, Metges CC. 2006. Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *The Journal of Nutrition* **136**:1198–1202.
- Lugli GA et al. 2019a. Dissecting the evolutionary development of the *Bifidobacterium animalis* species through comparative genomics analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **85**:1–16.
- Lugli GA et al. 2019b. Unveiling Genomic Diversity among Members of the Species *Bifidobacterium pseudolongum*, a Widely Distributed Gut Commensal of the Animal Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* **85**
- Lugli GA, Fontana F, Tarracchini C, Mancabelli L, Milani C, Turrioni F, Ventura M. 2022. Exploring the biodiversity of *Bifidobacterium asteroides* among honey bee microbiomes. *Environmental Microbiology* **12**:5666–5679
- Madigan MT, Martinko J. M., Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. 2015. *Brock biology of microorganisms* (14th ed.) MA: Pearson Education. Boston.
- Malukiewicz J et al. 2022. Bifidobacteria Define Gut Microbiome Profiles of Golden Lion Tamarin (*Leontopithecus rosalia*) and Marmoset (*Callithrix* sp.) Metagenomic Shotgun Pools.
- Mandal P, Biswas A, K C, Pal UK. 2011. Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *American Journal of Food Technology* **6**:87–102.
- Markowiak-Kopeć P, Slizewska K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens* **10**:1–20.
- Marti R, Dabert P, Pourcher A-M. 2009. Pig Manure Contamination Marker Selection Based on the Influence of Biological Treatment on the Dominant Fecal Microbial Groups. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:4967–4974.
- Masco L, Huys G, Brandt ED, Temmerman R, Swings J. 2005. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **102**:221–230.
- Masco L, Huys G, Gevers D, Verbruggen L, Swings J. 2003. Identification of *Bifidobacterium* Species Using rep-PCR Fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology* **26**:557–563.
- Masco L, Ventura M, Zink R, Huys G, Swings J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Microbiology Society*.

- Mattarelli P, Bonaparte C, Pot B, Biavati B. 2008. Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. nov. Microbiology Society.
- Mattarelli P, Holzappel W, Franz CMAP, Endo A, Felis GE, Hammes W, Pot B, Dicks L, Dellaglio F. 2014. Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **64**:1434–1451.
- Matteuzzi D, Crociani F, Zani O, Trovatelli LD. 1971. *Bifidobacterium suis* n. sp.: A new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig faeces. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie **11**:387–395.
- Maxwell FJ, Duncan SH, Hold G, Stewart CS. 2004. Isolation, growth on prebiotics and probiotic potential of novel bifidobacteria from pigs. Anaerobe **10**:33–39.
- Mayer HK, Amtmann E, Philippi E, Steinegger G, Mayrhofer S, Kneifel W. 2007. Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. International Dairy Journal **17**:565–573.
- Mayrhofer S, Domig KJ, Amtmann E, Hoek AHAMV, Petersson A, Mair C, Mayer HK, Kneifel W. 2007. Antibiotic Susceptibility of *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium pseudolongum* Isolates from Animal Sources. Journal of Food Protection **70**:119–124.
- McCormack U et al. 2017. Exploring a Possible Link between the Intestinal Microbiota and Feed Efficiency in Pigs. Applied and environmental microbiology **83**:1–16.
- McFall-Ngai M et al. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences **110**:3229–3236.
- Mekadim C, Bunesova V, Vlková E, Hroncová Z, Killer J. 2019. Genetic marker-based multi-locus sequence analysis for classification, genotyping, and phylogenetics of the family *Bifidobacteriaceae* as an alternative approach to phylogenomics. Antonie van Leeuwenhoek **112**:1785–1800.
- Michelini S, Modesto M, Filippini G, Spiezio C, Sandri C, Biavati B, Pisi A, Mattarelli P. 2016. *Bifidobacterium aerophilum* sp. nov., *Bifidobacterium avesanii* sp. nov. and *Bifidobacterium ramosum* sp. nov.: Three novel taxa from the faeces of cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus* L.). Systematic and Applied Microbiology **39**:230–236.
- Milani C et al. 2017. Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. The ISME journal **11**:2834–2847.
- Mitsuoka T. 1969. Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals (including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov. spec. and *Bifidobacterium pseudolongum* nov. spec). Zentralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. 1. Abt. Medizinisch-Hygienische Bakteriologie, Virusforschung Und Parasitologie. Originale **210**:52–64.
- Modesto M, D’Aimmo MR, Stefanini I, Trevisi P, De Filippi S, Casini L, Mazzoni M, Bosi P, Biavati B. 2009. A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. Livestock Science **122**:248–258.
- Modesto M, Stefanini I, D’Aimmo MR, Nissen L, Tabanelli D, Mazzoni M, Bosi P, Strozzi GP, Biavati B. 2011. Strategies to augment non-immune system based defence mechanisms against gastrointestinal diseases in pigs. NJAS – Wageningen Journal of Life Sciences **58**:149–156.

- Modrackova N, Stovicek A, Burtscher J, Bolechová P, Killer J, Domig KJ, Neuzil-Bunesova V. 2021. The bifidobacterial distribution in the microbiome of captive primates reflects parvorder and feed specialization of the host. *Scientific Reports* **11**:1–13.
- Mohar Lorbeg P, Golob M, Kramer M, Treven P, Bogovič Matijašić B. 2021. Evaluation of Dietary Supplements Containing Viable Bacteria by Cultivation/MALDI-TOF Mass Spectrometry and PCR Identification. *Frontiers in Microbiology* **12**:1–14.
- Mølbak L, Thomsen LE, Jensen TK, Bach Knudsen KE, Boye M. 2007. Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine. *Journal of Applied Microbiology* **103**:1853–1867.
- Neuzil-Bunesova V et al. 2021. Five novel bifidobacterial species isolated from faeces of primates in two Czech zoos: *Bifidobacterium erythrocebi* sp. nov., *Bifidobacterium moraviense* sp. nov., *Bifidobacterium oedipodis* sp. nov., *Bifidobacterium olomucense* sp. nov. and *Bifidobacterium panos* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **71**:1–12.
- Niedziałkowska M et al. 2021. Clear phylogeographic pattern and genetic structure of wild boar *Sus scrofa* population in Central and Eastern Europe. *Scientific Reports* **11**.
- O’Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**:925.
- Paliy A, Gujvinska S, Livoshchenko L, Nalivayko L, Livoshchenko Y, Risovaniy V, Dubin R, Berezhna N, Paliy A, Petrov R. 2020. Specific composition of indigenous microflora (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp.) in farm animals. *Ukrainian Journal of Ecology* **10**:43–48.
- Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry* **61**:100–111.
- Patil Y, Gooneratne R, Ju X-H. 2020. Interactions between host and gut microbiota in domestic pigs: a review. *Gut Microbes* **11**:310–334.
- Pérez G, Cardell E, Zárata V. 2002. Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leuconostoc mesenteroides* subspecies isolated from Tenerife cheese. *Letters in Applied Microbiology* **34**:82–85.
- Pechar R, Killer J, Mekadim C, Geigerová M, Rada V. 2017a. Classification of Culturable Bifidobacterial Population from Colonic Samples of Wild Pigs (*Sus scrofa*) Based on Three Molecular Genetic Methods. *Current Microbiology* **74**:1324–1331.
- Pechar R, Killer J, Salmonová H, Geigerová M, Svejtil R, Švec P, Sedlacek I, Rada V, Benada O. 2017b. *Bifidobacterium apri* sp. nov., a thermophilic actinobacterium isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **67**:2349–2356.
- Pecka-Kiełb E, Bujok J, Mišta D, Króliczewska B, Górecka J, Zawadzki W. 2016. In Vitro Study of Caecal and Colon Microbial Fermentation Patterns in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Folia Biologica* **64**:31–36.
- Persat A, Nadell CD, Kim MK, Ingremeau F, Siryaporn A, Drescher K, Wingreen NS, Bassler BL, Gitai Z, Stone HA. 2015. The Mechanical World of Bacteria. *Cell* **161**:988–997.
- Petersson A, Domig K, Nagel P, Zollitsch W, Hagmueller W, Kneifeld W. 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)-based monitoring of intestinal Lactobacilli and Bifidobacteria of pigs during a feeding trial. *Archives of animal nutrition* **63**:112–126.

- Petrelli S et al. 2022. Population genomic, olfactory, dietary, and gut microbiota analyses demonstrate the unique evolutionary trajectory of feral pigs. *Molecular Ecology* **31**:220–237.
- Pluske JR, Turpin DL, Kim J-C. 2018. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)* **4**:187–196.
- Purkrťová S, Zdeňková L, Fanta P, Junková P, Musilová Š, Němečková I, Demnerová K. 2018. Využití maldi-tof ms pro identifikaci bakterií způsobujících kažení mlékárenských výrobků. *Mlékařské listy* **29**:25–31.
- Quartieri A, Simone M, Gozzoli C, Popovic M, D'Auria G, Amaretti A, Raimondi S, Rossi M. 2016. Comparison of culture-dependent and independent approaches to characterize fecal bifidobacteria and lactobacilli. *Anaerobe* **38**:130–137.
- Rada V, Petr J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods* **43**:127–132.
- Reese AT, Chadaideh KS, Diggins CE, Beckel M, Callahan P, Ryan R, Thompson ME, Carmody RN. 2019. Parallel signatures of mammalian domestication and human industrialization in the gut microbiota. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Reese AT, Chadaideh KS, Diggins CE, Schell LD, Beckel M, Callahan P, Ryan R, Emery Thompson M, Carmody RN. 2021. Effects of domestication on the gut microbiota parallel those of human industrialization. *eLife* **10**:1–27
- Regmi PR, Metzler-Zebeli BU, Gänzle MG, van Kempen TATG, Zijlstra RT. 2011. Starch with high amylose content and low in vitro digestibility increases intestinal nutrient flow and microbial fermentation and selectively promotes bifidobacteria in pigs. *The Journal of Nutrition* **141**:1273–1280.
- Rios-Covian D, Gueimonde M, Duncan SH, Flint HJ, de los Reyes-Gavilan CG. 2015. Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiology Letters* **362**:1–7.
- Rodriguez C, Hakimi D-E, Vanleyssem R, Taminiau B, Broeck JV, Delmée M, Korsak N, Daube G. 2017. *Clostridium difficile* in beef cattle farms, farmers and their environment: Assessing the spread of the bacterium. *Veterinary Microbiology* **210**:183–187.
- Rodriguez C, Martiny J. 2020. Evolutionary relationships among bifidobacteria and their hosts and environments. *BMC Genomics* **21**:1–12.
- Sakata S, Kitahara M, Sakamoto M, Hayashi H, Fukuyama M, Benno Y. 2002. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **52**:1945–1951.
- Samarzija D, Sikora S, Redzepovic S, Antunac N, Havranek J. 2002. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures. *Microbiological Research* **157**:13–17.
- Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. 2012. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrometry Reviews* **32**:188–217.
- Satokari RM, Vaughan EE, Smidt H, Saarela M, Mättö J, de Vos WM. 2003. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology* **26**:572–584.
- Satti M, Modesto M, Endo A, Kawashima T, Mattarelli P, Arita M. 2021. Host-Diet Effect on the Metabolism of *Bifidobacterium*. *Genes* **12**:1–12.
- Savignac HM, Tramullas M, Kiely B, Dinan TG, Cryan JF. 2015. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural Brain Research* **287**:59–72.



- Scardovi V, Crociani F. 1974. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: Three New Species and Their Deoxyribonucleic Acid Homology Relationships. Microbiology Society.
- Scardovi V, Trovatelli LD, Biavati B, Zani G. 1979. *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Microbiology Society.
- Scardovi V, Trovatelli LD, Crociani F, Sgorbati B. 1969. Bifidobacteria in bovine rumen. *Archiv für Mikrobiologie* **68**:278–294.
- Sgorbati B, Biavati B, Palenzona DL. 1995. The genus *Bifidobacterium*. The genera of lactic acid bacteria **2**:279–306.
- Shang P, Wei M, Duan M, Yan F, Chamba Y. 2022. Healthy Gut Microbiome Composition Enhances Disease Resistance and Fat Deposition in Tibetan Pigs. *Frontiers in Microbiology* **13**:1–15.
- Sharma M, Wasan A, Sharma R. 2021. Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. *Food Bioscience* **41**:1–10.
- Simpson PJ, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP. 2004a. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of Microbiological Methods* **57**:9–16.
- Simpson PJ, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2004b. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. Microbiology Society.
- Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. 2003. Genomic Diversity and Relatedness of Bifidobacteria Isolated from a Porcine Cecum. *Journal of Bacteriology* **185**:2571–2581. American Society for Microbiology.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**:1–16.
- Splichalová A, Pechar R, Killer J, Splichalová Z, Neuzil-Bunesova V, Vlková E, Salmonová HS, Splichal I. 2020. Colonization of Germ-Free Piglets with Mucinolytic and Non-Mucinolytic *Bifidobacterium boum* Strains Isolated from the Intestine of Wild Boar and Their Interference with *Salmonella Typhimurium*. *Microorganisms* **8**:1–20.
- Staněk L, Prusík F. 2020. Využití a přínos sofistikované metody MALDI-TOF. Odborný recenzovaný časopis SYNLABIANER.
- Stenman LK, Burcelin R, Lahtinen S. 2015. Establishing a causal link between gut microbes, body weight gain and glucose metabolism in humans – Towards treatment with probiotics. *Beneficial microbes* **7**:1–12.
- Sun Z et al. 2015. Comparative Genomic Analysis of 45 Type Strains of the Genus *Bifidobacterium*: A Snapshot of Its Genetic Diversity and Evolution. *PLOS ONE* **10**:1–14.
- Tang J et al. 2008. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods* **75**:432–436.
- Tannock GW. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Molecular Biology* **1**:53–64.
- Taras D, Vahjen W, Simon O. 2007. Probiotics in pigs — modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. *Livestock Science* **108**:229–231.

- Theel ES. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacterial and fungal isolates. *Clinical Microbiology Newsletter* **35**:155–161.
- Tissier M. 1899. La reaction chromophile d'Escherich et le Bacterium coli. *CR Soc Biol* **51**:943–945.
- Tsuchida S, Maruyama F, Ogura Y, Toyoda A, Hayashi T, Okuma M, Ushida K. 2017. Genomic Characteristics of *Bifidobacterium thermacidophilum* Pig Isolates and Wild Boar Isolates Reveal the Unique Presence of a Putative Mobile Genetic Element with tetW for Pig Farm Isolates. *Frontiers in Microbiology* **8**:1–11.
- Turroni F, Sinderen D van, Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* **149**:37–44.
- Tuson HH, Weibel DB. 2013. Bacteria-surface interactions. *Soft matter* **9**:4368–4380.
- Tzortzis G, Goulas AK, Gee JM, Gibson GR. 2005. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *The Journal of Nutrition* **135**:1726–1731.
- Uhlík O, Strejček M, Hroudová M, Demnerová K, Macek T. 2013. Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem – od kultivace k metagenomice. *Chemické listy* **8**:614–622.
- Uhr G. 2014. The intestinal tract and the peyer's patch dimensions of wild boars (*sus scrofa* L., 1758) and domestic pigs (*sus scrofa* f. *domestica*). an allometric comparison. *Journal of Mountain Ecology* **3**:77–82.
- Ushida K, Tsuchida S, Ogura Y, Toyoda A, Maruyama F. 2016. Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of *suidae*. *Animal Science Journal – Nihon Chikusan Gakkaiho* **87**:835–841.
- Veloo A, Elgersma PE, Friedrich A, Nagy E, van Winkelhoff AJ. 2014. The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **20**:1092–1097
- Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald GF, Gupta RS, van Sinderen D. 2007a. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**:351–372.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007b. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* **71**:495–548.
- Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R. 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS microbiology ecology* **36**:113–121.
- Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF, Sinderen D van. 2007c. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **120**:2–12.
- Ventura M, Turroni F, Lugli GA, van Sinderen D. 2014. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**:163–168.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**:205–223.

- Vincent D, Roy D, Mondou F, Déry C. 1998. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology* **43**:185–193.
- Vlková E, Salmonová H, Bunesova 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.
- Von Ah U, Mozzetti V, Lacroix C, Kheadr E, Fliss I, Meile L. 2007. Classification of a moderately oxygen-tolerant isolate from baby faeces as *Bifidobacterium thermophilum*. *BMC microbiology* **7**:1–11.
- Vondruskova H, Slamova R, Trckova M, Zraly Z, Pavlik I. 2009. Alternative to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: A review. *Vet Med-Czech* **55**:199–224.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**:4407–4414.
- Wang X, Zhang Y, Wen Q, Wang Y, Wang Z, Tan Z, Wu K. 2020. Sex Differences in Intestinal Microbial Composition and Function of Hainan Special Wild Boar. *Animals: an Open Access Journal from MDPI* **10**:1–13
- Ward P, Roy D. 2005. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait* **85**:23–32.
- Wei L, Zhou W, Zhu Z. 2022. Comparison of Changes in Gut Microbiota in Wild Boars and Domestic Pigs Using 16S rRNA Gene and Metagenomics Sequencing Technologies. *Animals: an open access journal from MDPI* **12**:1–18.
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**:965–974.
- Worobey M. 2010. Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol* **8**:1–18.
- Wylensek D et al. 2020. A collection of bacterial isolates from the pig intestine reveals functional and taxonomic diversity. *Nature Communications* **11**:1–26.
- Yang G, Shi C, Zhang S, Liu Y, Li Z, Gao F, Cui Y, Yan Y, Li M. 2020. Characterization of the bacterial microbiota composition and evolution at different intestinal tract in wild pigs (*Sus scrofa ussuricus*). *PeerJ* **8**:1–21.
- Yang H et al. 2022. ABO genotype alters the gut microbiota by regulating GalNAc levels in pigs. *Nature* **606**:358–367.
- Yanokura E, Oki K, Makino H, Modesto M, Pot B, Mattarelli P, Biavati B, Watanabe K. 2015. Subspeciation of *Bifidobacterium longum* by multilocus approaches and amplified fragment length polymorphism: Description of *B. longum* subsp. *suillum* subsp. nov., isolated from the faeces of piglets. *Systematic and Applied Microbiology* **38**:305–314.
- Young Park S, Lee DK, Mi An H, Gyeong Cha M, Baek EH, Rae Kim J, Lee SW, Kim MJ, Lee KO, Joo Ha N. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of *Bifidobacterium* isolates from healthy adult Koreans. *Iranian Journal of Biotechnology* **9**:173–180.
- Zani G, Biavati B, Crociani F, Matteuzzi D. 1974. Bifidobacteria from the Faeces of Piglets. *Journal of Applied Bacteriology* **37**:537–547.
- Zhang S-H, Shen L-Y, Luo J, Wu Z-H, Jiang Y-Z, Tang G-Q, Li M-Z, Bai L, Li X-W, Zhu L. 2015. Analysis of carcass and meat quality traits and nutritional values of hybrid wild boars under different crossing systems. *Genetics and Molecular Research* **14**:2608–2616.

- Zhou J, Wu L, Deng Y, Zhi X, Jiang Y-H, Tu Q, Xie J, Van Nostrand JD, He Z, Yang Y. 2011. Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. *The ISME journal* **5**:1303–1313.
- Zhu L, Li W, Dong X. 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1619–1623.

## 9 Seznam tabulek a obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Buněčná morfologie <i>Bifidobacterium apri</i> .....	11
<b>Obrázek 2:</b> Fylogenetický strom rodu <i>Bifidobacterium</i> .....	13
<b>Obrázek 3:</b> Relativní četnost bakterií u skupin domácích, komerčních a divokých prasat .....	18
<b>Obrázek 4:</b> Potřebné vlastnosti probiotik .....	25
<b>Obrázek 5:</b> Hlavní otázky při posuzování bezpečnosti probiotických bakterií .....	29
<b>Obrázek 6:</b> Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru .....	36
<b>Obrázek 7:</b> Princip metody MALDI-TOF MS .....	37
<b>Obrázek 8:</b> Mapa České republiky se sledovanými lokalitami divokých a domácích prasat .....	51
<b>Obrázek 9:</b> Kmenová variabilita druhu <i>B. apri</i> s pěti odlišnými skupinami profilů .....	55
<b>Obrázek 10:</b> Kmenová variabilita druhu <i>B. thermophilum</i> .....	56
<b>Obrázek 11:</b> (A) Kmenová variabilita <i>B. animalis</i> ; (B) Kmenová variabilita <i>B. boum</i> .....	57
<b>Tabulka 1:</b> Seznam kmenů bakterií izolovaných ze střeva prasat v DSMZ sbírce .....	18
<b>Tabulka 2:</b> Příklady komerčně dostupných probiotik .....	27
<b>Tabulka 3:</b> Příklady komerčně dostupných prebiotických přípravků dostupných na trhu .....	31
<b>Tabulka 4:</b> Wilkins-Chalgren bujón se sójovým peptonem .....	44
<b>Tabulka 5:</b> Rozmezí pro skóre u vyhodnocování MALDI-TOF MS výsledků .....	46
<b>Tabulka 6:</b> Složení PCR směsi s množstvím na 1 µl DNA .....	46
<b>Tabulka 7:</b> Teplotní režimy v termocykleru pro REP-PCR .....	47
<b>Tabulka 8:</b> Úspěšnost identifikace bifidobakterií na úroveň druhu a rodu .....	49
<b>Tabulka 9:</b> Druhové zastoupení bifidobakterií dle stáří divokých prasat .....	54
<b>Tabulka 10:</b> Druhové zastoupení bifidobakterií v rámci pohlaví .....	54
<b>Graf 1:</b> Úspěšnost identifikace na úroveň druhu, rodu a bez možnosti identifikace .....	48
<b>Graf 2:</b> Četnost sledovaných druhů bifidobakterií u divokých a domácích prasat .....	49
<b>Graf 3:</b> Druhové zastoupení bifidobakterií v rámci lokalit divokých prasat v ČR .....	52
<b>Graf 4:</b> Druhové zastoupení bifidobakterií v rámci lokalit domácích prasat v ČR .....	53