

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Mikroorganismy štěpící celulosu a jejich aktivita
v bachoru jelena evropského
(*Cervus elaphus*)

Doktorská disertační práce

Doktorand: Ing. Jiří Šimůnek

Školitel: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc., a prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Jan Kopečný, DrSc.

Praha 2017

"Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma Mikroorganismy štěpící celulosu a jejich aktiva v bachoru jelena evropského (*Cervus elaphus*) vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací a doporučení školitele.

V Mnichově Hradišti dne: 31.08. 2017

.....
Ing. Jiří Šimůnek

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svým školitelům prof. Ing. Vojtěchovi Radovi a prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a laskavý přístup při vypracování disertační práce.

vypracování této diplomové práce na

Dále děkuji svému konzultantu Ing. Janu Kopečnému, DrSc. za odborné vedení a umožnění vypracování práce v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky.

A neposlední řadě děkuji svým rodičům a blízkých za podporu během studia.

Abstrakt

Mikrobiální komunita domácích přežvýkavců v bachoru je jedním z nejlépe charakterizovaných systémů schopných účinného rozkladu biomasy. Současná studie je zaměřena na mikrobiální ekologii v bachoru nedomestikovaných zvířat. Dosud byly prezentovány jen některé studie mikrobiální ekologie volně žijících přežvýkavců. V této konkrétní studii jsme rozšířili znalosti z oblasti mikrobiální ekologie volně žijících přežvýkavců prostřednictvím analýzy mikrobiomu v bachoru jelena evropského (*Cervus elaphus*) v České republice v konfrontaci s domácími přežvýkavci.

Pro definici rozmanitosti a složení mikrobiálních komunit v obsahu bachoru byly použity molekulárně genetické metody, DGGE, qPCR, NGS. Kultivačními technikami byly izolovány kmeny bakterií s celulytickou aktivitou. U vybraného izolátu byla provedena základní enzymologická analýza celulas a použity některé proteomické techniky. Vzorky k analýzám byly odebrány z bachoru jelena evropského (*Cervus elaphus*), daňka skrnitého (*Dama dama*), ovce domácí (*Ovis aries*) a tura domácího (*Bos primigerius*). Ekologické a statistické analýzy výsledků ukázaly rozmanitost v porovnání jednotlivých bakteriálních a houbových komunit v analyzovaných vzorcích. Ve všech vzorcích dominovaly kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, u hub dominoval rod *Orpinomyces*.

Relativní množství jednotlivých bakterií se liší jak mezi jednotlivými zvířaty jednoho druhu, tak i v rámci druhů. Rozmanitost mezi jednotlivými vzorky byla potvrzena i analýzou gelu DGGE pomocí softwaru Bionumerics v. 7.2.1., kterým byly detekovány jednotlivé bandy vzorků, na základě čehož byla provedena PCoA analýza a sestaven dendrogram (dendrogram) pomocí UPGMA with Pearsons correlation. Dále byla provedena studie zastoupení hlavních představitelů celulytických bakterií *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens* u jednotlivých zvířat. Bylo prokázáno, že počty jednotlivých druhů bakterií se liší mezi jednotlivými druhy zvířat i populací. Dále bylo izolováno 47 čistých bakteriálních kultur s celulytickou aktivitou. Vybraný kmen C10 *Actinomyces* sp., byl podroben genotypové, fenotypové a proteomické analýze. Kmen C10 je podobný s *Actinomyces glycerinitolerans* a *Actinomyces succinicruminis*. Byly popsány vlastnosti celulas kmene C10 a výsledky byly publikovány.

Výsledky této studie ukazují, že bakteriální rozmanitost v bachoru divokých i domácích přežvýkavců je značná z pohledu počtů jednotlivých druhů bakterií a hub mezi přežvýkavci. Struktura jednotlivých druhů mikroorganismů je podobná. Z našich zjištění vyplývá,

že bachorové mikrobiomy volně žijících přežvýkavců jsou aktivnější a efektivnější v degradaci rostlinných substrátů.

Tato studie ukazuje, že mikrobiální rozmanitost v bachorem volně žijících přežvýkavců vykazuje značnou podobnost s mikrobiomem v bachorem domácích přežvýkavců. Dřívější studie zaměřené na domácí přežvýkavce však nebyly reprezentativní pro mikrobiální rozmanitost v bachorech divokých přežvýkavců, a proto by studie mikrobiální diversity u volně žijících přežvýkavců měly pokračovat a měly by být rozšířeny formou izolací a charakterizací nových druhů bakterií a jejich enzymů zaměřených na degradaci celulosy.

Klíčová slova: bachor, přežvýkavci, diverzita, celulolytické bakterie, enzymy

Abstract

The rumen microbial community of ruminants is one of the well-characterized systems capable of effectively decomposing biomass. The present is focused on microbial ecology in rumen of non-domesticated animals. Only some studies of the microbial ecology of wild ruminants have been presented so far. In this particular study, we have extended our knowledge in field of the microbial ecology of wild ruminants by analyzing the bacterial populations in rumens of *Cervidae* animals in the Czech in comparison with domestic ruminants.

Molecular genetic approach (DGGE, qPCR, NGS) was used to define the diversity and composition of microbial communities in rumen content. Cultivation techniques were used for isolation of bacterial strains with cellulolytic activity. The selected isolates were subjected to basic enzyme analysis of cellulose activities and some proteomic techniques were used. Samples for analysis were taken from the European Deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), domestic sheep (*Ovis aries*) and domestic tour (*Bos primigerius*). Ecological and statistical analysis of the results showed the high level of microbial diversity in comparison of the individual bacterial and fungal communities in the analyzed samples. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were found to be dominant in all specimens, the most numerous genus of fungi was *Orpinomyces* spp.

The relative amount of individual bacteria varies between animals of one species and among species. The diversity between samples was confirmed by DGGE gel analysis using the Bionumerics v. 7.2.1 software, which detected individual sample bands, based on PCoA analysis and a dendrogram using UPGMA with Pearsons correlation. The Next Generation method of sequencing (NGS) was used to define diversity and composition of microbial communities in rumen content. This method is based on principle of hypervariable areas focus VS-V3 16S rDNA: 11 samples of red deer (*Cervus elaphus*), 2 samples of roe deer (*Capreolus capreolus*), 1 sample of fallow deer (*Dama dama*) and 1 sample of the sheep (*Ovis aries*). Ecological and statistical analysis of results obtained from QIIME software showed considerable diversity in analysed samples when particular bacterial communities compared. In all samples *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla were dominant. Furthermore, a study of the most important representatives of cellulolytic bacteria (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*) were carried out in individual animals. It has been shown that the number of single species of bacteria varies between animal species and populations. In all ruminants the same dominant bacteria phyla

Bacteroidetes and *Firmicutes* were found. They differed in relative numbers of detected sequences. Statistically significant differences in particular sequences frequency were proven for uncultured *Bacteriodales* bacteria order, *Clostridiales*, for uncultured *Ruminococcaceae* bacteria family, for *Prevotella* and *Selemonas* orders in samples obtained from roe deers. Furthermore, statistically significant differences were also found for uncultured *Lachnospiraceae* bacteria family in sheep and *Ruminococcus* bacteria species in red deers. This study suggests that diversity of bacterial community in rumen of wild ruminants shows considerable similarity to those bacterial populations in rumen of domesticated ruminants. Furthermore, 47 pure bacterial cultures with cellulolytic activity were isolated. The selected strain of C10 *Actinomyces* sp., was subjected to genotypic, phenotypic and proteomic analysis. Strain C10 is similar to *Actinomyces glycerinitolerans* and *Actinomyces succinicruminis*. The cellulosic properties of C10 strain were described and the results were published.

The results of this study show that bacterial diversity in the rumen of wild and domestic ruminants is considerable in terms of the numbers of species of bacteria and fungi among ruminants. The structure of individual species of microorganisms is similar. Our findings suggest that rumen microbiomes of wild ruminants are more active and more effective in degradation of plant substrates. However, previous studies were not representative of microbial diversity in wild ruminant rumen, therefore studies of microbial diversity in wild ruminants should continue and should be expanded by means of isolation and characterization of new bacterial species and their enzymes aimed at degradation of cellulose.

Keywords: rumen, herbivores, diversity, celulolytic bacteria, enzymes

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1. Jelen evropský.....	13
2.1.1. Skladba potravy jelení zvěře.....	13
2.1.2. Význam struktury a složení krmiv pro jelení zvěř.....	14
2.2. Schopnost přežvýkavců využívat krmiva.....	15
2.3. Bachorový mikrobiální ekosystém.....	16
2.3.1. Bakterie.....	18
2.3.2. Prvoci.....	21
2.3.3. Houby.....	23
2.3.4. Bakteriofágy.....	23
2.4. Mikrobiální fermentace.....	24
2.4.1. Bachorová fermentace.....	24
2.4.2. Mikrobiální proteosyntéza.....	26
2.4.3. Fermentace v tlustém střevě.....	27
2.5. Rostlinná pletiva a jejich štěpení.....	28
2.5.1. Struktura celulosy.....	29
2.5.2. Mikrobiální konsorcia.....	29
2.5.3. Celulolytické bakterie.....	31
2.5.4. Hydrolýza celulosy.....	32
2.6. Metody pro studium mikroorganismů v bachoru.....	35
2.6.1. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE).....	36
2.6.2. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-Time, qPCR).....	36
2.6.3. Sekvenování nové generace (Next generation sequencing NGS).....	37
3. HYPOTÉZY	38
4. CÍL PRÁCE	38
5. MATERIÁL A METODY	39
5.1. Materiál.....	39
5.1.1. Komerční kity.....	39
5.1.2. PCR primery.....	40
5.1.3. Roztoky pro práci s DNA.....	42
5.1.4. Kultivační média.....	43
5.1.5. Použité roztoky při stanovení enzymových aktivit.....	48
5.1.6. Použité přístroje.....	48
5.2. Metody.....	50
5.2.1. Odběr vzorků.....	50
5.2.2. Charakteristika lokality volného chovu jelenů v oblasti Strážného.....	54
5.2.3. Charakteristika lokality oborního chovu jelenů v oboře Aglája u Dobříše.....	54
5.3. Molekulárně-genetický screening zastoupení celulolytických mikroorganismů v bachorovém obsahu jelena evropského pomocí molekulárně-genetických metod.....	54
5.3.1. Izolace DNA.....	54
5.3.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) – Amplifikace úseku 16S rDNA.....	54
5.3.3. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE).....	55
5.3.4. Sekvenování.....	56
5.3.5. Příprava agarózového gelu.....	56

5.3.6. Next generation sequencing	57
5.3.7. Real – Time - qPCR	58
5.4. Izolace čistých kultur celulolytických mikroorganismů kultivačními technikami anaerobní mikrobiologie a jejich biochemická a sekvenanční identifikace pomocí 16S rDNA. Ověření biochemické aktivity vybraných kmenů při štěpení různých typů celulosy, zejména aktivity celulasy (EC 3.2.1.4), endoglukanasy (EC 3.2.1.6) a celobiohydrolasy (EC 3.2.1.91).....	59
5.4.1. Izolace celulolytických bakterií	59
5.4.2. Kultivace celulolytických bakterií	59
5.4.3. Izolace DNA.....	59
5.4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR) – Amplifikace úseku 16S rDNA	59
5.4.5. Sekvenování	60
5.4.6. DNA – stanovení příbuznosti bakterií.....	60
5.4.7. Fylogenetické studie.....	61
5.4.8. Fenotypová charakterizace	61
5.4.9. Ověření biochemické aktivity vybraných kmenů při štěpení různých typů celulosy, zejména aktivity celulasy (EC 3.2.1.4), endoglukanasy (EC 3.2.1.6) a celobiohydrolasy (EC 3.2.1.91)	63
5.5. Stanovení enzymové aktivity a substrátové specifity, zymografická analýza	63
5.5.1. Stanovení aktivity enzymů celulasy a xylanasy (Lever, 1977).....	63
5.5.2. Stanovení aktivity β -glukosidasy (Saha et al., 1996).....	64
5.5.3. Stanovení aktivity celobiohydrolasy (Deshpande et al., 1984).....	64
5.5.4. Stanovení proteinů (Bradford, 1976)	65
5.5.5. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Laemmli, 1970).....	65
5.5.6. Zymografie (Flint et al., 1994).....	67
5.6. Izolace vybraného proteinu metodou gelové filtrace na Sephadexu.....	68
5.7. Stanovení vlastností enzymu (pH optimum, teplotní optimum, stanovení inhibičního spektra).....	68
6. VÝSLEDKY A DISKUSE	69
6.1. Molekulárně-genetický screening zastoupení celulolytických mikroorganismů v bacherovém obsahu jelena evropského pomocí molekulárně-genetických metod	69
6.1.1. Charakteristika bakterií v bacheru pomocí DGGE	69
6.1.2. Kvantifikace bakterií v bacheru pomocí qPCR.....	84
6.1.3. Celkové zhodnocení analýzy DGGE + qPCR.....	85
6.1.4. Molekulárně genetický screening bakterií v bacheru jelenů pomocí NGS.....	87
6.1.5. Molekulárně genetický screening bakterií v bacheru přežvýkavců pomocí NGS	100
6.1.6. Molekulárně genetický screening hub v bacheru přežvýkavců pomocí NGS	110
6.1.7. Biochemická aktivita extracelulárních enzymů bacherových obsahů	115
6.2. Izolace čistých bakteriálních kultur a ověření jejich biochemické celulolytické aktivity	116
6.2.1. Popis a charakteristika kmene C10	121
6.3. Purifikace a charakterizace enzymu kmene C10.....	132
6.3.1. Gelové filtrace na Sephadexu.....	132
6.4. Stanovení vlastností enzymu CM-celulasy (pH optimum, teplotní optimum stanovení inhibičního spektra).....	134
6.4.1. Stanovení pH optima.....	134
6.4.2. Stabilita pH.....	134
6.4.3. Stanovení teplotního optima.....	135
6.4.4. Stanovení teplotní stability.....	136
6.4.5. Vliv iontů a chemikálií na aktivitu CM-celulasy	137

6.5. Zymografie celulosové aktivity na CMC PAGE a stanovení molekulové hmotnosti isoforem endocelulasy.....	139
6.6. Dvourozměrná elektroforéza proteinů kmene.....	140
7. ZÁVĚR.....	142
8. SEZNAM LITERATURY	145

1. ÚVOD

Jelen evropský (*Cervus elaphus*) patří mezi býložravce (*herbivora*) a největšího volně žijícího přežvýkavce na našem území. Přežvýkavci jsou typičtí a unikátní tím, že přijímají potravu ve formě rostlinného materiálu, bohatý na strukturní polysacharidy, které mohou být fermentovány pouze prostřednictvím mikrobiální populace kolonizující trávicí trakt přežvýkavců.

Bachor přežvýkavců představuje orgán, který obsahuje komplexní anaerobní mikrobiotu umožňující hostitelskému zvířeti využívat prostřednictvím biochemické aktivity mikroorganismů vlákninu, kterou zvíře přijímá v potravě (Hungate, 1976; Hobson, 1997; Sadet et al., 2007). Energie obsažená v chemických vazbách strukturních polysacharidů rostlinných pletiv se pomocí mikrobiálních fermentačních procesů za účasti enzymů stává pro býložravce využitelnou. V průběhu mikrobiální fermentace (biomasy) rostlinných pletiv obsažených v krmivu dochází ke vzniku těkavých mastných kyselin, které spolu s biomasou mikroorganismů jsou plně využívány hostitelem.

Degradace vlákniny zprostředkovaná mikrobiálním konsorciem představuje hlavní proces nutriční strategie býložravých zvířat (Stevens and Hume, 1995; Dunne et al., 2012; Gharechahi et al., 2014). Toto velmi komplexní mikrobiální společenství v bachoru přežvýkavců je tvořeno především bakteriemi, prvoky a anaerobními houbami. Největší podíl na štěpení vlákniny mají celulólytické bakterie (Miron et al., 1989; Jun et al., 2007; Kobayashi et al., 2008). Jejich vlastností a ekologický význam v trávicím traktu domácích přežvýkavců jsou pro pochopení a případné ovlivnění procesů využití biomasy klíčové a jsou středem vědeckého zájmu již po dlouhou dobu, vzhledem k jejich potenciální využitelnosti v průmyslových aplikacích zpracování vlákniny. Přesto jejich fyziologie a hlavně struktura a aktivita jejich enzymového komplexu štěpící celulosu (tzv. celulosomu) stále objasněna zcela nebyla. V důsledku objevení existence anaerobních hub v bachoru a jejich fibrolytického potenciálu se pozornost ve studiu degradace vlákniny přesunula i na tyto mikroorganismy. Anaerobní bachorové houby se aktivně podílejí na degradaci vlákniny a na rozrušení rostlinných pletiv, čímž umožňují pronikání bakterií do míst, které jsou pro ně bez působení hub nedostupné (Orpin and Joblin, 1997; Stewart et al., 1997; Williams and Coleman, 1997; Nicholson et al., 2010; Khejornsart et al., 2011). Jejich příspěvek k degradaci vlákniny obsažené v krmivu je v důsledku jejich vysoké celulólytické, hemicelulólytické a xylanolytické aktivity nesporný, ale jejich podíl na celkové bachorové

fermentaci dosud nebyl přesně kvantifikován. Značný podíl na degradaci vlákniny v bachoru mají také prvoci.

Studium struktury mikrobiálních společenstev osídlující trávicí trakt býložravých zvířat je stěžejním východiskem pro poznání významu těchto mikrobiomů pro hostitelský organismus (Kamra, 2005). S příchodem molekulárně genetických metod, které umožňují detekovat a identifikovat přítomnost mikroorganismů na základě jejich genetické informace (na bázi složení nukleových kyselin) došlo ke zcela novému přístupu ke studiu složení, výskytu a aktivity celulólytické mikrobioty. Momentálně se odhaduje, že klasickými kultivačními technikami bylo možné zjistit pouze 10 – 30 % druhů osídlující bachor (Kochrginskaya et al., 2001; Koike et al., 2007; Koike et al., 2010), takže pohled na mikrobiální ekosystém před zavedením molekulárně genetických přístupů byl značně omezený. S ohledem na prudký rozvoj metodických přístupů a taxonomických studií lze konstatovat, že studium struktury složení mikroorganismů v bachoru je stále aktuální.

Většina prací v této oblasti výzkumu je zaměřena s ohledem na dostupnost a ekonomický význam na domácí přežvýkavce (Grüninger et al., 2014). Lze předpokládat, že podobnou strukturu mikroorganismů schopných štěpit vlákninu lze pravděpodobně nalézt i v bachoru volně žijících býložravců (Jami and Mizrahi, 2015). Jen minimum studií je zaměřeno na mikrobiální strukturu bachorového ekosystému u volně žijících přežvýkavců a jsou zaměřeny mimo naše geografické podmínky, konkrétně se jedná o studie ve Skandinávii, Kanadě, Číně a Japonsku. V důsledku složení potravy a poměrné nedotčenosti mikrobiálních ekosystémů trávicího traktu lidskými zásahy v podobě racionalizace krmné dávky, zavádění netradičních krmiv a přidavku krmných doplňků lze předpokládat u volně žijících přežvýkavců, zejména u jelenovitých, naturálnější strukturu mikroorganismů vyjádřenou odlišností a vyšší fermentační účinností při štěpení vlákniny (Hofmann, 1989; Ichimura et al., 2004; Asano et al., 2005; 2008; Tanentzap et al., 2009; Khejornsart et al., 2011; Pope et al., 2012).

Studium struktury celulólytické mikrobiální populace u volně žijících přežvýkavců a jejich vlastností může být nástrojem pro poznání biologie těchto zvířat a východiskem pro zvýšení účinnosti degradace rostlinných substrátů obecně (Grüninger et al., 2014).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. *Jelen evropský*

Tento druh zvěře se vyznačuje teritorialitou a vysokými potravními nároky. Jelení zvěř patří do našeho kulturního a přírodního bohatství, které by měl člověk zachovat i pro budoucnost. Její velkou výhodou je vysoká přizpůsobivost a vývojová plastičnost, pomocí které se tato zvěř dokáže způsobovat a reagovat na současné civilizační tlaky, jež působí negativně na existenci velkých divokých zvířat.

Tento druh patří mezi přežvýkavce, což znamená, že zvíře při příjmu potravy zkonsumuje velké množství potravy, kterou poté v době klidu přežvykuje a tráví (Hofmann, 1989). Samotné trávení probíhá v předžaludcích především vlivem mikroorganismů, které se podílejí nejen na trávení, ale dále chrání přežvýkavce před nežádoucími mikroorganismy, které využívají trávicí trakt jako vstup do organismu. Prostředí trávicího traktu je osídlováno velkým počtem mikroorganismů, tento počet může několikanásobně převyšovat celkový počet buněk přežvýkavce. Tyto mikroorganismy pomáhají přežvýkavcům využívat rostlinný materiál, který je pro ostatní druhy živočichů bez těchto organismů nestravitelný (Sawanon et al., 2011).

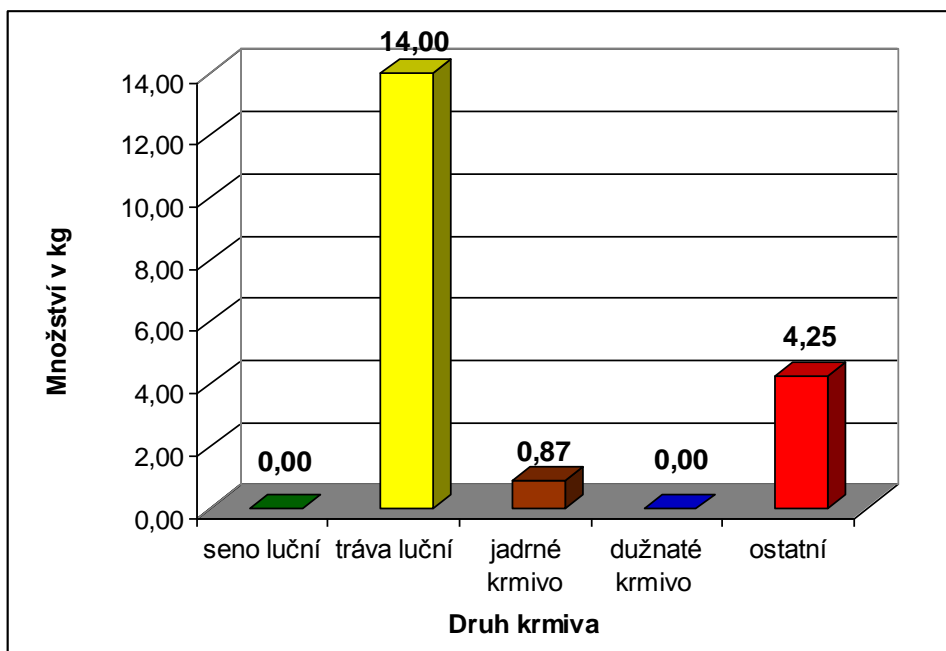
Jelen evropský je výlučný býložravý přežvýkavec. Složení jeho potravy se mění v závislosti na ročním období. Jedinou výjimkou je celoroční spásání travin a bylin, které nachází na lesních mýtinách, podél cest a v okolí lesa (Durantel, 2004).

Přirozená potrava je tvořena řadou rostlinných druhů vyskytující se na našem území. Skladba přirozené potravy je totožná jako v ostatních částech Evropy. Aktuální stav životního prostředí vlivem civilizace a industrializace prostředí, ve kterém zvěř žije již neposkytuje volný výběr rostlinné potravy (Lochman, 1985; Sundset et al., 2010). Důležité je v dnešní době zvěři zachovat klidové oblasti v jejím přirozeném prostředí pro příjem potravy (Jelínek, 2007). Posledním faktorem, který ovlivňuje příjem potravy je roční období, které ovlivňuje a mění požadavky na složení a poměr jednotlivých složek potravy (Sundset et al., 2009). Týká se to především letního a zimního období.

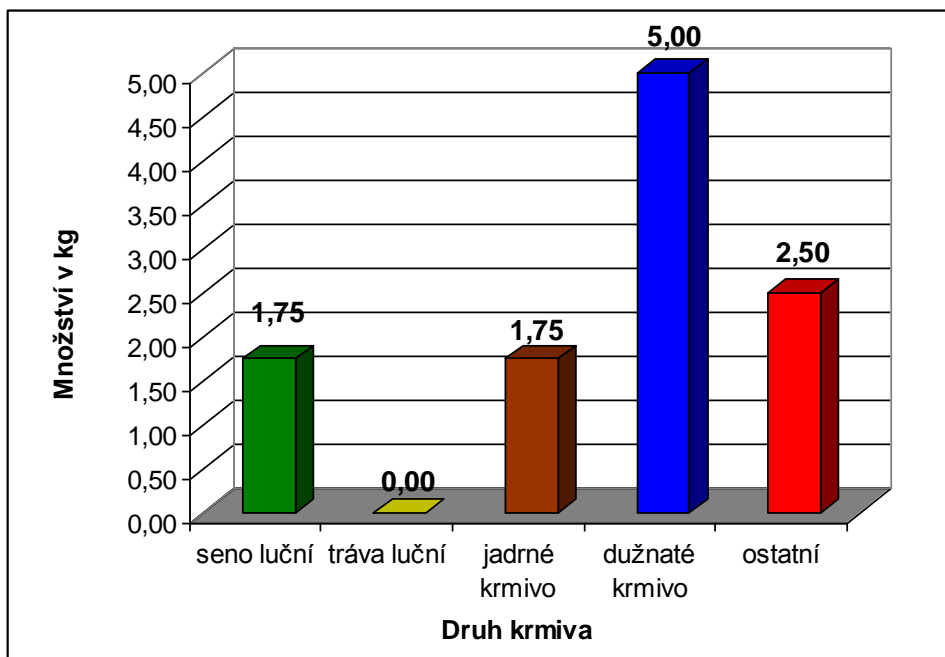
2.1.1. Skladba potravy jelení zvěře

Skladba potravy (obrázek 1, obrázek 2) jelení zvěře se v průběhu roku značně mění a je závislá na několika faktorech. Jelikož se jedná o divoká zvířata žijící ve volné přírodě, její složení potravy ovlivňuje střídání klimatických faktorů, věk zvěře, pohlaví, druh předkládané

potravy, rušení zvěře vlivem činnosti člověka či ostatních živočichů, zdravotní stav a kvalita předkládané potravy.



Obrázek 1: Průměrné složení potravy jelena evropského v letním období (Zabloudil and Vala, 2009)



Obrázek 2: Průměrné složení potravy jelena evropského v zimním období (Zabloudil and Vala, 2009)

2.1.2. Význam struktury a složení krmiv pro jelení zvěř

Životní podmínky pro jelení zvěř byly v posledních padesáti letech výrazně v České republice změněny. Původní lesní porosty a lužní lesy byly ve většině případech nahrazeny

smrkovými monokulturami nebo lesní porosty ustoupily intenzivnímu zemědělství, které vůbec nerespektuje potřeby volně žijící zvěře. Úživnost životního prostoru pro zvěř se radikálně změnila a především zhoršila. V důsledku těchto změn životního prostředí se v tomto kontrastu změnil i biotop jelení zvěř, která je dnes převážně vytlačena do smrkových monokultur v oblastech s vyšší nadmořskou výškou. Jelení zvěř vyžaduje pro správnou výživu nenahraditelné lesní pastviny, louky a světliny, jejichž výměra však značně poklesla. Snaha o kompenzaci deficitů v biotopu zvěře vede často k provozování intenzivních forem oborních chovů nebo alespoň k intenzivnímu příkrmování jelení zvěře držené ve volnosti v zimním období, kdy zvěř nenalézá v přirozeném prostředí dostatek kvalitní potravy. Tyto způsoby péče o jelení zvěř však musí respektovat fyziologické požadavky zvěře dané především stavem bachorové fermentace. I v zimním období musí být hlavním zdrojem energie pro jelení zvěř celulóza s velikostí částic 8 mm, která je štěpena celulólytickými bakteriemi (Hintnaus, 2011). Mechanické vlastnosti hrubé vlákniny musí umožnit přežvykování, k čemu zvěř potřebuje dostatek klidu. Celulóza je pro jelení zvěř klíčovou složkou potravy udržující při životě a v činnosti celulólytickou mikroflóru, která zmožňuje z vlákniny uvolnit dostatečné množství energie ve formě těkavých a mastných kyselin. V literatuře se uvádí, že obsah hrubé vlákniny v zažitém bachoru je odhadováno celoročně na 50 % sušiny (Hintnaus, 2010). Pokud nebude pro jelení zvěř zajištěno dostatečné množství krmiv s vysokým obsahem celulózy, dochází u zvěře k hladovění, čímž zvěř začne hledat náhradní zdroje vlákniny a tímto může docházet k poškozování lesních porostů vlivem loupání, případně okusem nebo ohryzem kůry zvěří.

2.2. Schopnost přežvýkavců využívat krmiva

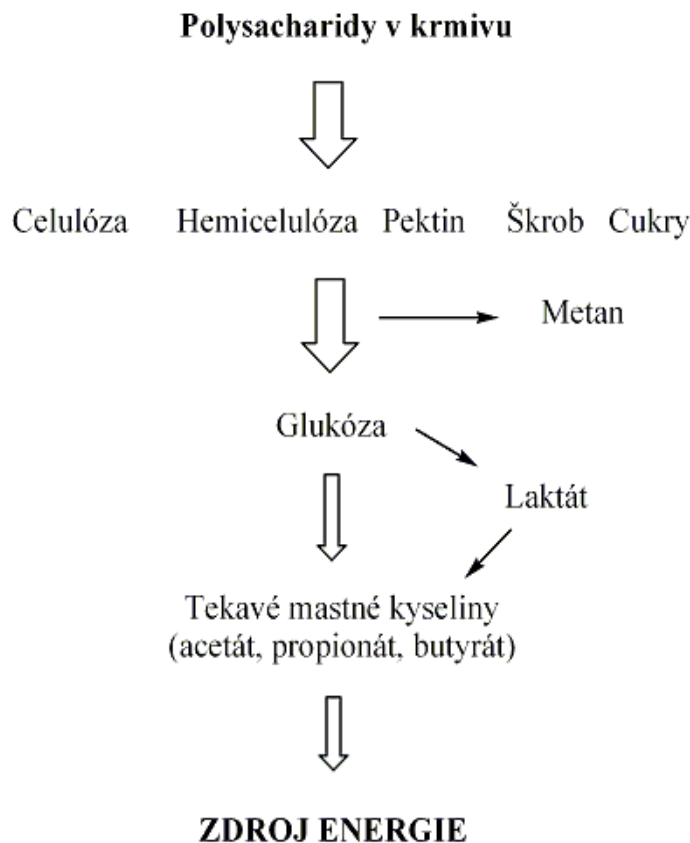
Schopnost přežvýkavců trávit a využívat krmiva, která jsou tvořena rostlinnými pletivými, jim umožňuje anaerobně probíhající fermentace, kterou zajišťují mikroorganismy v předžaludcích (Wilson, 2011; Myer et al., 2015). Jelenoví jsou stejně jako ostatní přežvýkavci na symbiotickém spojení s těmito mikroorganismy osídlujícími trávicí trakt vyloženě závislí. Hlavní předností fermentace v předžaludcích je, že hostitelský organismus nevyužívá pouze metabolity vzniklé působením mikrobiálních enzymů na tráveninu, ale i biologicky vysoce hodnotnou stále se množící biomasu mikroorganismů, která se stává dalším zdrojem potravy v postgastrickém trávicím procesu (Flint, 1997). Pregastrická fermentace probíhá v předžaludcích, nejvíce v bachoru a postgastrická fermentace probíhá ve slepém střevu a v tračníku.

Fermentace umožňuje trávit vlákninu obsaženou v těchto krmivech. Vedle toho však přináší symbiotický vztah s mikrobiálním ekosystémem hostitelskému organismu další výhody. Např. vlivem proteosyntézy mikroorganismů dochází k efektivnějšímu využívání nebílkovinných dusíkatých látek za vzniku hodnotné bílkoviny, která může být přežvýkavcem dále využívána jako dietní složka. Základní podmínkou pro fungování těchto systémů je však existence komplexního nenarušeného bachorového ekosystému a příjem dostatečného množství relativně kvalitního objemu vlákniny. Za určitých podmínek může docházet k narušení optimální fermentace a k degradaci plnohodnotných bílkovin a k proteolýze. Ostatní ztráty vznikají u jednodušších energetických živin. Ideální úpravou krmiv a složením krmné dávky lze negativní vlivy omezit a využít potenciál mikrobiálního trávení (Russel and Hespell, 1981).

2.3. Bachorový mikrobiální ekosystém

Bachor obsahuje jeden z nejkompexnějších a nejstudovanějších mikrobiálních ekosystémů v naší přírodě (Hungate, 1966; Hobson 1997; Hespell et al., 1997). Bachor má charakter fermentoru, který vytváří ideální prostředí pro růst, rozmnožování a látkovou výměnu mikroorganismů (Frey et al., 2009; Jami and Mizrahi, 2015). Uvnitř bachoru je velice stabilní a biochemicky aktivní mikrobiální ekosystém, který se skládá z mnoha článků, které jsou propojeny celou řadou vzájemných interakcí jak mezi sebou, tak i mezi hostitelským organismem (Mackie, 2002; Moon, et al., 2010). Tyto články umožňují přežvýkavci využívat krmiva (obrázek 3) se změnou na živiny cenné pro organismus hostitele (Li et al., 2015a).

Vývoj mikroorganismů v bachoru pozitivně ovlivňují vybrané druhy krmiv, jako jsou např. seno, pastva, okopaniny, které svými pletivy poskytují substrát (Li et al., 2015b). Negativní vliv na mikroorganismy mohou mít krmiva dieteticky a nutričně nevhodná jako jsou nekvalitní siláže, které během několika dní mohou poškodit mikrobiální osazení bachoru nebo jej úplně zlikvidovat. Dále negativně mohou působit dietní nedostatky, nedodržení žádoucího poměru živin, hygienické nedostatky atd. Jestliže chceme docílit kvalitního zdravotního stavu a vysoké užitkovosti zvěře, je nutné optimálně využívat živiny, které jsou velice důležité a ovlivňují úroveň bachorové fermentace (Veselý et al., 1984). Je tedy zřejmé, že příjem dostatečného množství vláknin je limitní nejenom pro dosažení efektivního bachorového fermentačního procesu, ale představuje i základní podmínku pro rozvoj předžaludku jako takového.



Obrázek 3: Využití strukturálních polysacharidů z krmiva

Studium mikrobiálního složení batoru do 40. let minulého století využívalo anaerobních technik a simultánního prostředí batoru. Zmíněnou metodou bylo popsáno velké množství mikrobiálních druhů osídlující bator přežvýkavců (Hungate, 1950). Příchodem revolučních molekulárně biologických metod v 90. letech došlo k přesné taxonomii mikroorganismů osídlující bator (Wanapat, et al., 2009; Kong et al., 2010; Leng et al., 2011).

Mikrobiální složení batoru je tvořeno třemi druhy mikroorganismů:

1. Bakterie – nejpočetnější skupina v batorovém ekosystému, jejich počet je $10^{10} - 10^{11}$ buněk v 1 ml batorového obsahu, jsou zastoupeny několika tisíci anaerobními druhy, tvoří 50 % populace batoru (Krause and Russel, 1996),
2. Prvoci – je druhá nejpočetnější skupina mikroorganismů, jejich počet je $10^4 - 10^6$ prvoků na v 1 ml batorového obsahu, jejich zastoupení je kolem 40 druhů, tvoří 40 % populace batoru (Kamra, 2005),
3. Houby – třetí skupina mikroorganismů, jejich počet je kolem 10^5 v 1 ml batorového obsahu, jejich zastoupení je 16 druhů (Kittelmann et al., 2012),

4. Bakteriofágy – poslední skupina mikroorganismů, jejich počet je kolem 10^8 – 10^9 v 1 ml bachorového obsahu (Kamra, 2005).

2.3.1. Bakterie

Bakteriální druhy osídlující bachor podle své významnosti z hlediska potřeby degradace jsou řazeny před prvoky a houby. Jejich význam spočívá především ve zprostředkování fermentačního procesu s produkcí těkavých mastných kyselin (Jami and Mizrahi, 2015). Početnost bakterií v 1 ml bachorového obsahu se během dne mění vlivem zředění bachorových mikroorganismů vlivem příjmu potravy, vody a slinami. Dalším faktorem, kterým se může snížit počet bakterií v bachoru je dlouhodobé hladovění, čímž je bachorová fermentace narušena. Bachorová fermentace se vrátí do normálního stavu do dvou dnů od doby, kdy hladovění přestalo.

Členění bachorových bakterií je u autorů velice rozdílné. Každý autor se řídí odlišnými pravidly. Někteří upřednostňují dělení morfologické, jiní provádějí zařazení podle substrátů, které bakterie fermentují nebo metabolických produktů (tabulka 1). V našem případě jsem zvolil členění podle vztahu k substrátu zavedené autorem, který položil základy členění bachorových bakterií (Hungate, 1966):

1. Celulolytické bakterie: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium lochheadii*, *Clostridium longisporum*,
2. Hemicelulolytické bakterie: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus*, *Eubacterium xylanophilum*, *Eubacterium uniformis*,
3. Lipolytické bakterie: *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Treponema bryantii*, *Eubacterium*, *Fusocillus*, *Micrococcus*, *Clostridium lundense*,
4. Pektinolytické bakterie: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multiparus*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Treponema saccharophilum*,
5. Amylolytické bakterie: *Ruminobacter amylophylus*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*, *Prevotella ruminicola*,
6. Ureolytické bakterie: *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus bromii*, *Treponema sp.*, *Megasphaera elsdenii*,

7. Proteolytické bakterie: *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Clostridium bifermentans*,
8. Bakterie produkující cukry: *Succinovibrio dextrinosolvens*, *Succinovibrio amylolytica*, *Treponema bryantii*, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Selenomonas ruminantium*,
9. Bakterie produkující methan: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanococcus mobilis*, *Methanosarcina barkeri*,
10. Bakterie produkující amoniak: *Prevotella ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*,
11. Bakterie produkující kyseliny: *Veillonella parvula*, *Oxalobacter formigenes*, *Megasphaera elsdenii*, *Wollinella succinogenes*, *Desulphoribrio desulphuricans*.

Podle způsobů života v bachorovém ekosystému lze bakterie členit do 5 skupin (Cheng and Costerton, 1980; McCallister et al., 1994, Miron et al., 2001):

1. Bakterie žijící volně v bachoru – tvoří kolem 25 % celkové populace bakterií, jejich příspěvek k trávení je skoro nulový,
2. Bakterie volně vázané na částice potravy – podíl na trávení je minimální,
3. Bakterie pevně vázané na částice potravy – tvoří 75 % celkové populace bakterií, mají hlavní podíl na tvorbě energie,
4. Bakterie vázané na epitel bachoru – podíl na trávení je minimální,
5. Bakterie vázané na povrch bachorových prvků – podíl na trávení minimální.

Tabulka 1: Enzymatické aktivity a metabolické produkty hlavních bachorových bakteriálních druhů (Hespell, 1984)

DRUH BAKTERIE	AKTIVITA	PRODUKTY
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	C, A	F, A, S
<i>Ruminococcus albus</i>	C, X	F, A, E, H, C
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	C, X,	F, A, S, H
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	C, X, PR	F, A, L, B, E, H, C
<i>Clostridium lochheadii</i>	C, PR	F, A, B, E, H, C
<i>Streptococcus bovis</i>	A, SS, PR	L, A, F
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	A, P, PR	F, A, S
<i>Prevotella ruminicola</i>	A, X, P, PR	F, A, P, S
<i>Succinimonas amylolytica</i>	A, D	A, S
<i>Selenomonas ruminantium</i>	A, SS, GU, LU, PR	A, L, P, H, C
<i>Lachnospira multiparus</i>	P, PR, A	F, A, E, L, H, S
<i>Succinovibrio dextrinosolvans</i>	P, D	F, A, L, S
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	M, HU	M
<i>Methanosarcina barkeri</i>	M, HU	M, C
<i>Spirochete sp.</i>	P, SS	F, A, L, S, E
<i>Megasphaera elsdenii</i>	SS, LU	A, P, B, V, CP, H, C
<i>Lactobacillus sp.</i>	SS	L
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	L, GU	A, P, S
<i>Eubacterium ruminantium</i>	SS	F, A, B, C

Legenda tabulky:

- **Aktivita:** (C) celulólytická, (X) xylanolytická (A) amylolytická, (D) dextrinolytická, (P) pektinolytická, (PR) proteolytická, (L) lipolytická, (M) metanogenní, (GU) využití glycerolu, (LU) využití laktátu, (SS) využití cukrů, (HU) využití vodíku
- **Produkty:** (F) formiát, (A) acetát, (P) propionát, (B) butyrát, (L) laktát, (E) etanol, (S) sukcinát, (V) valerát, (CP) kapronát, (H) vodík, (C) oxid uhličitý, (M) metan

2.3.2. Prvoci

V bachorovém prostředí se vyskytuje kolem 160 druhů prvoků. Počty prvoků v bachoru jsou ovlivněny složením krmiv, pH, průběhem trávení a fyziologickým stavem přežvýkavce (Ozutsumi et al., 2005; Jouany et al., 2006). Uvádí se, že v 1 ml bachorové tekutiny za dobrých fyziologických podmínek je 300 – 700 tisíc prvoků. Množství prvoků je ovlivňováno způsobem výživy a jejich přítomnost v bachoru je považována za dobrou úroveň bachorového trávení. Prvoci jsou stejně jako bakterie závislí na způsobu a době krmení. Jsou náročnější na živiny než bakterie a také citlivější na změny prostředí. V případě dlouhodobého hladovění přežvýkavce dochází k vymizení prvoků z bachoru.

Prvoci tvoří 40 % mikrobiálního osídlení bachoru. V bachoru se jich nachází kolem 40 druhů, především zástupců třídy *Ciliate*, která se dělí na dvě podtřídy *Holotricha* a *Entodiniomorpha* (Hungate, 1966; Kamra, 2005; Skillman, 2006).

Do podtřídy *Holotricha* patří rody *Isotricha* a *Dasytricha*. Rody *Isotricha* a *Dasytricha* fermentují cukry a rod *Isotricha* fermentuje škrob.

Druhy prvoků podtřídy *Holotricha* podle Karmy (2005):

1. *Isotricha prostoma* – druh, který byl nalezen v bachoru ovce domácí, vodního bůvola, jelena evropského, kozy domácí, skotu zebu a antilopy jelení,
2. *Isotricha intestinalis* – druh, který byl nalezen v bachoru domácího skotu, bizona, jelena evropského,
3. *Dasytricha ruminantium* – druh potvrzen v bachoru ovce domácí, antilopa jelení a vodního bůvola,
4. *Oligoisotricha Bupalii* – druh potvrzen v bachoru vodního bůvola a domácího skotu.

Do podtřídy *Entodiniomorpha* patří rody *Diplodinium*, *Entodinium* a *Epidinium*. Všechny tyto rody jsou schopny fermentovat hemicelulosu, pektin a škrob (Kittelman and Janssen, 2011). První dva rody jsou schopny fermentovat celulosu nebo se na její degradaci podílet (Williams and Coleman, 1985; 1997). Jelikož jsou typickými heterotrofními organismy, mají vysoké nároky na výživu, protože nejsou schopny syntetizovat některé aminokyseliny a k růstu potřebují vitamíny a růstové látky. Metabolity jejich fermentace jsou kyseliny octová, máselná a mléčná, dalšími produkty jejich fermentace je vodík a CO².

Druhy prvoků podtřídy *Entodiniomorpha* podle Kamry (2005):

1. *Entodinium bovis* – druh byl nalezen v bachoru jugoslávského skotu, skotu zebu a vodního bůvola,
2. *Entodinium bupalum* – druh byl nalezen v bachoru vodního bůvola,
3. *Entodinium bursa* – druh byl nalezen v bachoru domácího skotu, ovce domácí a kozy domácí,
4. *Entodinium caudatum* – druh byl nalezen v bachoru domácího skotu, ovce domácí a kozy domácí,
5. *Entodinium chatterjeei* – druh byl nalezen v bachoru indické kozy a vodního bůvola,
6. *Entodinium longinucleatum* – druh byl nalezen v bachoru domácího skotu a vodního bůvola,
7. *Diplodinium dendatum* – druh byl nalezen v bachorech většiny zvířat,
8. *Diplodinium indicum* – druh byl nalezen v bachoru indického skotu,
9. *Eremoplastron asiaticus* – druh byl nalezen v bachoru indického skotu,
10. *Eremoplastron Bubalus* – druh byl nalezen v bachoru brazilského skotu a vodního bůvola,
11. *Eudiplodinium maggii* – druh byl nalezen v bachorech většiny zvířat,
12. *Ostracodinium trivesiculatum* – druh byl nalezen v bachoru domácího skotu a vodního bůvola,
13. *Polyplastron multivesiculatum* – druh byl nalezen v bachoru domácího skotu, ovce domácí, kozy domácí a antilopy jelení,
14. *Metadinium medium* – druh byl nalezen v bachoru domácího skotu, vodního bůvola a bahnivce horského,
15. *Epidinium caudatum* – druh byl nalezen v bachoru domácího skotu, ovce domácí a kozy domácí,
16. *Ophryoscolex caudatus* – druh byl nalezen v bachorech většiny zvířat,
17. *Caloscolex camelicus* – druh byl nalezen v bachoru velblouda jednohrbého.

Jak je uvedeno výše, tak většina druhů prvoků obou podtříd byla nalezena a identifikována jak u domácích přežvýkavců, tak i u volně žijících přežvýkavců.

2.3.3. Houby

Přítomnost vláknitých anaerobních hub v bachoru přežvýkavců byla prokázána v 70. letech minulého. V té době byly popsány 3 druhy anaerobních hub (Orpin, 1977). Do dnešního dne bylo popsáno více než 21 druhů anaerobních bachorových hub, které jsou zařazeny do 6 rodů: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces* a *Cyllamyces* (Theodorou et al., 1996; Ozkose et al., 2001; Kamra, 2005; Nicholson et al., 2010; Kittelmann et al., 2012), následně byl zjištěn a potvrzen jejich fibrolytický potenciál, což zvýšilo zájem o studium těchto mikroorganismů (Orpin and Joblin 1997; Stewarta et al., 1997; Williams and Coleman, 1997; Khejornsart et al., 2011).

Členění nejvýznamnějších anaerobních hub podle Kamry (2005):

1. *Neocallimastix frontalis* – izolován z bachoru domácího skotu,
2. *Neocallimastix patriciarum* – izolován z bachoru ovce domácí,
3. *Neocallimastix hurleyensis* – izolován z bachoru domácího skotu,
4. *Sphaeromonas communis* – izolován z bachoru domácího skotu,
5. *Orpinomyces bovis* – izolován z bachoru domácího skotu,
6. *Anaeromyces mucronatus* – izolován z bachoru domácího skotu,
7. *Ruminomyces elegans* – izolován z bachoru domácího skotu,
8. *Piromyces minutus* – izolován z bachoru jelena evropského (Ho et al., 1993).

Bachorové houby se aktivně účastní trávení vlákniny a rozrušením rostlinných pletiv umožňují pronikání bakterií do míst, které jsou pro ně samotné nedostupné. Vzhledem k jejich vysoké celulytické, hemicelulytické a xylytické aktivitě je jejich úloha při trávení krmiva bohatého na vlákninu zásadní (Novotná et al., 2010; Nagpal et al. 2010). Bachorové houby získávají energii fermentací sacharidů. Celkový podíl na bachorové fermentaci se zcela přesně definovat zatím nepodařilo (Teunissen et al., 1993).

2.3.4. Bakteriofágy

Je to poslední skupina mikroorganismů vyskytující se v bachoru. Podle Kamry (2005) jejich množství v 1 ml bachorového obsahu je $10^8 - 10^9$. Bakteriofágy jsou viry bakterií a vyskytují se v bachoru ve značném množství. Jejich funkce spočívá ve schopnosti usmrcení nežádoucích druhů bakterií v bachoru, které mohou být pro bachor nežádoucí. Mrtvé nežádoucí bakterie potom slouží přežvýkavci jako zdroj aminokyselin ve formě biomasy (Klieve et al., 1993; 1999; Bach et al., 2002). Populace bakteriofágů v bachoru je specifická a různorodá pro jednotlivá zvířata v závislosti na složení potravy přežvýkavce.

2.4. Mikrobiální fermentace

Mikroorganismy u přežvýkavců hrají klíčovou úlohu v procesu trávení přijímané potravy (Gruninger, et al., 2014). Jejich vlivem dochází k mikrobiální fermentaci, která probíhá v předžaludcích a v tračníku. Působením fermentačních procesů získává přežvýkavec 4 výhody:

1. Degradaci strukturálních polysacharidů, mezi které patří celulóza, hemicelulóza a pektin, které jsou součástí rostlinné potravy. Pro přežvýkavce představují hlavní zdroj energie (Forsberg et al., 1997),
2. Schopnost mikroorganismů na sebe vázat neproteinový dusík, který je využíván k syntéze vlastní biomasy a v zažívacím traktu je z něho vytvořen zdroj hodnotných aminokyselin a proteinů,
3. Mikroorganismy syntetizují vitamíny a aminokyseliny v požadovaném množství,
4. Sekundární produkty mikroorganismů poskytují ochranný účinek před detoxikací rostlinných toxinů (Hume and Warner, 1980).

2.4.1. Bachorová fermentace

Většina druhů bakterií je schopna se podílet na fermentaci několika substrátů (Hespell et al., 1997). Nejvýznamnějším metabolismem probíhajícím v bachoru je metabolismus sacharidů (Lynd et al., 2002).

Bachorovou fermentaci lze kvantifikovat pomocí celkové produkce a proporciálního zastoupení těkavých a mastných kyselin (Khejornart et al., 2011; Kittelman et al., 2014). Při plnohodnotné krmné dávce je molární procento jednotlivých mastných kyselin v bachoru závislé především na typu krmné dávky a jejím složení (Asano et al., 2008; Hammond et al., 2013; Li et al., 2013; Ishaq et al., 2014; Myer et al., 2015).

Průměrné množství mastných kyselin v bachoru (v %):

1. kyselina octová: 50 – 60 % ,
2. kyselina propionová: 20 – 25 % ,
3. kyselina máselná: 10 – 20 % ,
4. kyselina mravenčí, valerová, kapronová a vyšší mastné kyseliny: 5 %.

Poměr mezi těkavými mastnými kyselinami v bachoru má význam pro vývoj a zdraví zvířete, který je ovlivněn složením krmné dávky (Schnorr et a., 2014). Podíl vlákniny v krmné dávce ovlivňuje vzájemný poměr produkovaných mastných kyselin. V případě nadměrného množství lehce stravitelných glycidů (např. jadrná krmiva) v krmné dávce, dojde

ke zpomalení až zastavení fermentace vlákniny. Dojde ke zvýšení produkce kyseliny mléčné a tím dojde ke zvýšení kyselosti v bachoru. V tomto důsledku dojde ke snižování pH a nastává acidóza, která vede ke snížení počtu některých významných mikroorganismů. Nejprve dochází ke snížení celulólytických mikroorganismů a následně dojde ke snížení většiny ostatních mikroorganismů a zásadně se změní druhové složení bachorového ekosystému (Braun et al., 1992). Fermentační procesy jsou závislé na podmínkách v bachorovém prostředí, především na hodnotě pH. Enzymy vykazují optimální aktivitu při tzv. fyziologickém rozmezí pH 6,2 – 6,8 (Kay, 1960). Stejně citlivé na změnu pH v bachorovém prostředí jsou fibrolytické bakterie (Braun et al., 1992).

Nepřežvýkaví býložravci tráví celulosu v tlustém střevě, masožravci ji nedovedou využít vůbec (Steward, 1997). Na fermentaci vlákniny se nepodílejí pouze celulólytické bakterie, ale také anaerobní houby produkcí fibrolytických enzymů (Mountfort and Asher, 1989; Nicholson et al., 2010). Pomocí enzymatických systémů bakterií, prvoků a hub dochází k odbourávání pektinu. Zásobní polysacharidy (škrob a pektin) jsou degradovány obdobným způsobem. Monosacharidy a disacharidy jsou zdrojem energie pro ostatní bakterie (Carberry et al., 2012; Kittelmann et al., 2013). Na fermentaci škrobu, dextrinů a lehce rozpustných cukrů se výrazně podílejí bachorové prvoci, kteří produkují oxid uhličitý, vodu, kyselinu octovou, kyselinu propionovou a kyselinu máselnou (Ishaq et al., 2014). Prvoci pohlcují zrnka škrobu a mění je na glykogen. Dochází ke kvašení a vzniku CO₂ a metanu díky symbiotickému spojení s metanogenními bakteriemi, které nasedají na povrch těl prvoků (Filay and Fenchel, 1992; Cieslak et al., 2013; Min et al., 2014). Tvorba těchto plynů vzniká při mikrobiální fermentaci sacharidů (Bartoš, 1987). Nejintenzivnější produkce je asi 4 hodiny po nakrmení zvířete. Plyny jsou odváděny z bachoru prostřednictvím vstřebáním do krve, vylučováním plícemi nebo krkáním do jícnu a dutiny ústní.

Z bachorového prostředí bylo izolováno malé množství lipolytických bakterií. U přežvýkavců se často přehlíží význam tuků. Tuky jsou důležité vlivem své energetické hodnoty a mají význam pro vznik esenciálních mastných kyselin a lipofilních vitamínů. Bachorové bakterie jsou také producenty vitamínu K a vitamínu B.

Proteolytické bakterie jsou schopny štěpit bílkoviny a také řada těchto bakterií je schopna rozkládat i sacharidy. Bakterie štěpí bílkoviny na aminokyseliny, které procházejí deaminací za vzniku amoniaku, mastných kyselin a oxidu uhličitého. Tento proces s vyšší biologickou hodnotou je z hlediska bílkovin nevýhodný, jelikož je snaha ochránit tyto bílkoviny a dopravit je do dalších částí trávicího traktu k enzymatickému štěpení.

Mimo degradačních procesů v bachoru také probíhá syntéza mikrobiálních bílkovin. Jednotlivé prvky jsou důležité pro tuto syntézu. Jsou k dispozici okamžitě a v požadovaném množství. Mezi jednotlivé prvky, které jsou důležité pro syntézu mikrobiálních bílkovin patří uhlík, energie vzniklá ze sacharidů a těkavých mastných kyselin a dusík z krmiva nebo ze syntetických zdrojů. Především prvoci jsou schopni syntetizovat ve svých tělech značné množství plnohodnotné živočišné bílkoviny z neplnohodnotných bílkovin rostlinných a z dusíkatých látek nebílkovinných (amidu, močoviny) s vysokou stravitelností (85 %). Biomasa jejich těl se stává zdrojem bílkovin pro přežvýkavce a jsou využívány v průběhu trávení v tenkém střevu (Russell and Hespell, 1981). Denní produkce je 100 – 150 g, což představuje až 25 % denní potřeby makroorganismu.

2.4.2. Mikrobiální proteosyntéza

Jedná se o syntézu probíhající v bachoru, která má význam pro hospodaření s dusíkatými látkami, především s bílkovinami, které se v bachoru štěpí na jednoduché dusíkaté složky, které jsou metabolizovány na mikrobiální bílkoviny (Inbrahim and Ingalls, 1972). Dusíkaté látky z biomasy produkované v bachoru představují 50 – 70 % dusíkatých látek potřebných pro organismus. Při mikrobiálním rozkladu bílkovin vzniká amoniak, který není při proteosyntéze zcela využit z důvodu nedostatečného množství mikroorganismů nebo v důsledku nedostatku energie. Při nadměrném příjmu dusíkatých látek se amoniak dostává do jater, kde dochází k ureosyntéze a tvorbě endogenní močoviny. Vzniklá močovina se zčásti vrací krví a slinami zpět do bachoru a z části se vylučuje močí. V případě, že nastane zvýšená produkce amoniaku a tím se dostane do jater v množství nad kapacitní možnosti ureosyntézy, dojde ke zvýšení obsahu amoniaku v krvi a důsledku toho nastávají klinické projevy intoxikace (zastavení motoriky bachoru – tympanie – otrava).

V případě příznivých nutričních podmínek je využito až 90 % nebílkovinného dusíku na mikrobiální bílkoviny. Asi 20 – 60 % bílkovin prochází předžaludky beze změny a k jejím trávení enzymatickou cestou dochází až dalších částech trávicího ústrojí. Aplikací syntetických zdrojů dusíkatých látek je možné zvýšit mikrobiální proteosyntézu, vlivem podání močoviny a čpavku. Mikroorganismy pro proteosyntézu musí mít v bachoru dostatek pohotové energie na adaptaci na tyto látky, která tvoří 30 % z celkové energie v krmivu. Pro tvorbu mikrobiální bílkoviny je stěžejní předkládat vhodné krmivo s dostatečným zdrojem dusíku (Wallace et al., 1987). Ideálním zdrojem dusíkatých látek v krmivu jsou lizy a silážní kyseliny. Produkční efekt s ohledem na mikrobiální proteosyntézu při podávání krmiv s plným krytím dusíkatých látek ze syntetických zdrojů je asi 60 – 70 % v porovnání

s bílkovinnými zdroji z tradičních krmiv. V případě porušení zásad ve využívání syntetického dusíku nebo neregulování přístupu zvířat k těmto zdrojům hrozí nebezpečí intoxikace organismu se smrtelným průběhem. Tímto dochází ke zvýšení pH v bachoru na hodnotu 7,5 a vyšší, dojde ke změně poměru mezi formou NH_3 a NH_4 ve prospěch NH_3 , která je snadno propustná přes buněčné membrány a tím dojde k urychlení intoxikace organismu. Intoxikace je velice rychlý proces, pohybující se v rozmezí 30 minut od podání močoviny v důsledku uvolnění amoniaku. Hlavními příčinami intoxikace jsou nedostatek energie, nedostatečný návyk na novou krmnou dávku a techniku jejího podávání nebo nevhodné formy úpravy krmiva (Veselý et al., 1984).

2.4.3. Fermentace v tlustém střevě

Tlusté střevo tvoří trubici, jejíž průměr se v průběhu střeva značně mění. Vlivem polohy a tvaru se tlusté střevo dělí na slepé střevo, tračník a konečník. V tračníku a slepém střevě u přežvýkavců probíhá sekundární fermentace vlákniny a nestrávených zbytků potravy, která je označována jako postgastriická (Hume, 1997). Při sekundární fermentaci dochází k odborávání 27 % přijaté celulosy a 40 % hemicelulosy (Bailey and McRae, 1970).

Tlusté střevo je vyplněno sloupcovitým epitelem obsahující pohárkovité buňky produkující viskózní a elastický gel zvaný mucin, který poskytuje ochrannou funkci tlustému střevě před přilnutím a invazí patogenních bakterií, mikrobiálních antigenů a toxinů (Allen, 1981). Dále mucin usnadňuje pohyb tráveniny tračníkem.

V tlustém střevě jsou téměř ideální podmínky pro bakterie. Podmínky jim umožňují jejich růst, množení i látkovou výměnu. Teplota v tlustém střevě je stálá a pohybuje se kolem tělesné teploty zvířete. pH se pohybuje v rozmezí 6,5 – 7,5, redoxní potenciál je -200 mV, což je prostředí pro mikrobiální populace obligátně anerobních bakterií (Faichney, 1968). Hustota bakteriální populace v tlustém střevě se pohybuje cca 10^{10} – 10^{11} buněk/ml (Ulyatt, 1975). V tlustém střevě se vyskytují 3 typy bakteriální populace:

1. bakterie adherované na krmivo,
2. bakterie adherované na epitel,
3. bakterie adherované na lumen střeva.

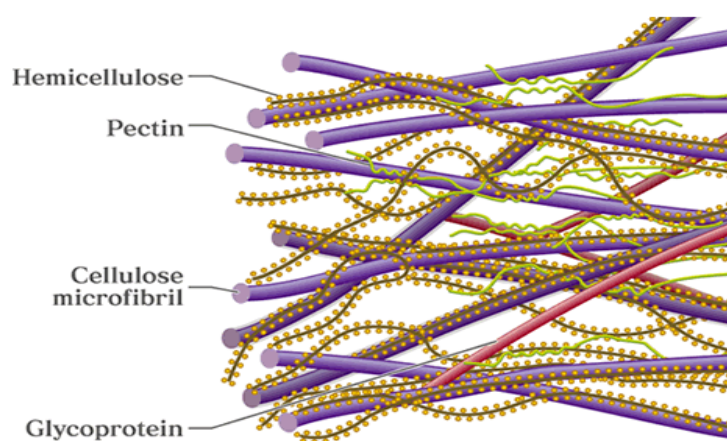
Složení bakteriální populace v tlustém střevě je podobné populaci v bachoru. Mezi hlavní zástupce bakteriálních druhů patří rody *Bacteroides*, *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* a *Selemonas* (Wolin, 1981). Složení bakteriální populace, její stabilita a počty jsou limitovány změnami v dietě zvířat.

V tlustém střevě dochází k fermentaci a vstřebávání metabolitů včetně těkavých mastných kyselin uvolněných působením tračnickových mikroorganismů, které využívají potravních komponentů, které unikají fermentaci v batoru. U přežvýkavců tento systém slouží jako doplňkový ke zvýšení fermentační účinnosti zkonsumovaného krmiva. U nepřezvýkavých zvířat funkci batoru právě přebírá funkci tlusté střevo. Fermentace stukturálních polysacharidů je ovlivněna množstvím komodit, které prošly nestrávené z předžaludků. Nejčastějšími komoditami, které přichází do tlustého střevo, a jejichž množství je ovlivněno množstvím a struktuře potravy, jsou účastny sekundární fermentace jsou celulosa, hemicelulosa a škrob. Porovnáním produkce a zastoupení jednotlivých těkavých mastných kyselin v batoru a tlustém střevě vychází na jevo, že v tlustém střevě je vyšší podíl kyseliny octové a nižší podíl kyseliny propionové, než v batoru. Tento jev je podle Myerse et al., (1967) způsoben nepřítomností prvoků v mikrobiomu tlustého střevo. Podíl jednotlivých těkavých mastných kyselin v tlustém střevě je ovlivněn složením potravy a změnami krmného režimu (Mann and Orskov, 1973).

2.5. Rostlinná pletiva a jejich štěpení

Potrava přežvýkavců je tvořena především z rostlin, které jsou složeny z rostlinných buněk. Vyšší rostliny mají při svém růstu primární stěnu rostlinné buňky složenu ze stukturálních polysacharidů a na jejich stavbě se ještě podílejí strukturální proteiny, glykoproteidy, ionty a enzymy (Lynd et al., 2002). Po ukončení růstu rostlinné buňky dojde k vytvoření sekundární buněčné stěny, jejichž hlavními stavebními složkami jsou lignin a suberin (Yung-Chung et al., 2009).

Mezi stukturální polysacharidy tvořící primární buněčnou stěnu patří celulosa, hemicelulosa a pektiny (obrázek 4). Celulosa je lineární polymer, který je tvořený glukosovými jednotkami spojenými β -1,4 glykosidickými vazbami (Bartoš, 1987). Hemicelulosa jsou tvořeny ve většině případů xylosovými jednotkami, které jsou spojené β -1,4 glykosidickými vazbami (Guozeng et al., 2011). Mezi hemicelulosa, které se nachází v primární buněčné stěně patří arabinoxylany, glukomanany, galaktomanany a glukuronoxylany. Pektiny patří do komplexních polysacharidů, které obsahují α -1,4 vázaný metylester kyseliny galakturonové a mohou obsahovat i malé množství galaktosy, glukosy, arabinosy a kyseliny glukuronové.



Obrázek 4: Struktura rostlinných pletiv

2.5.1. Struktura celulosy

Celulosa vytváří celulosové lineární a jednotlivé molekuly spletené ve svazky, které jsou propojené vodíkovými můstky a vytváří základní fibrily neboli protofibrily. Tyto fibrily jsou prostorově pravidelně uspořádány a proto se jím říká krystalická celulosa. Tvoří 50 – 90 % veškeré celulosy. Krystalická oblast celulosy je enzymaticky velice obtížně štěpitelná. V pravidelných intervalech je přerušována amorfními oblastmi, což je důležité z hlediska trávení. Jednotlivé protofibrily jsou obaleny vrstvou hemicelulos a pektinu a tím jsou od sebe odděleny. Svazek protofibril vytváří mikrofibrily a ty se skládají do fibril. Mikrofibrily jsou opět celé obaleny hemicelulosami a pektiny. Hemicelulosy a pektiny jsou vázány na protofibrily a mikrofibrily chemickou vazbou (vodíkovými můstky). Touto kombinací vzniká v přírodě jeden z biologicky i chemicky nejodolnější sacharidový komplex.

2.5.2. Mikrobiální konsorcia

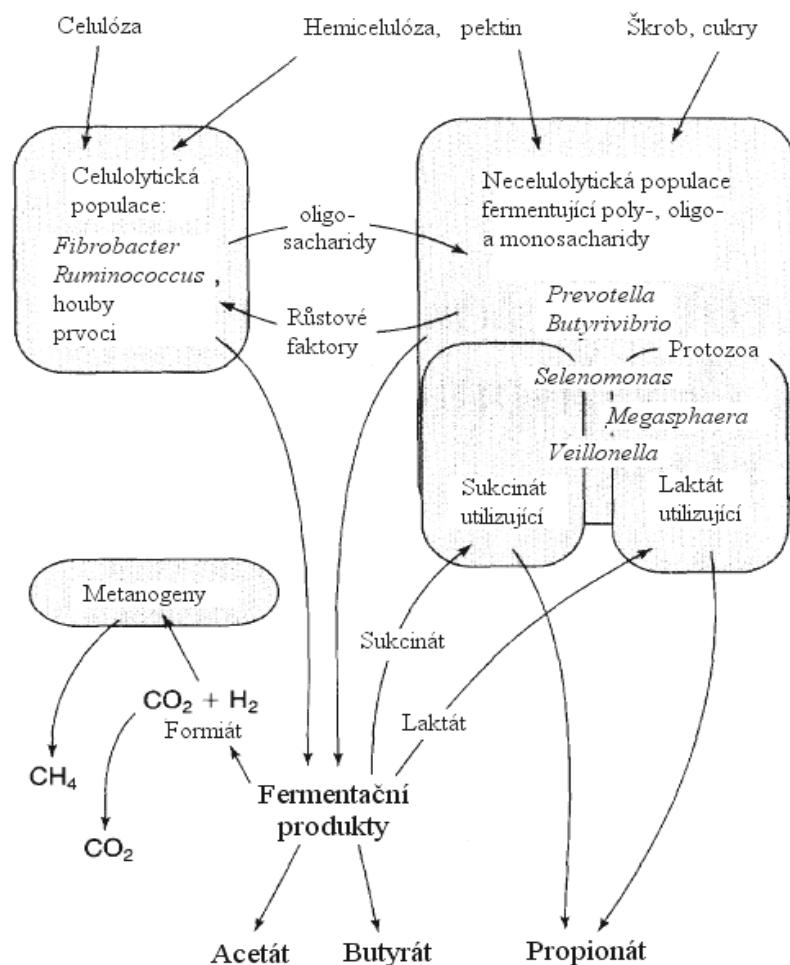
Rostlinný materiál s obsahem celulosy v batoru je tráven směsí batorových mikroorganismů (Lynd et al., 2002). Populací bakterií, prvoků a hub. Význam a účinnost jednotlivých mikroorganismů je však velice rozdílná a může mít pozitivní nebo negativní charakter. Interace mezi jednotlivými mikroorganismy jsou založeny na vzájemném poskytování živin nebo růstových podmínek. Interkace se nejvíce projevují při degradaci komponent krmiva, která je závislá na spolupráci celulolytických a necelulolytických mikroorganismů, důležitým faktorem je rychlost a účinnost degradace. V případě prvoků je jejich účinnost nejnižší. Doposud se nepodařilo jednoznačně prokázat, jestli jejich celulolytická aktivita není způsobena symbiózou s celulolytickými bakteriemi (obrázek 5).



Obrázek 5: Interakce mezi prvokem, bakteriemi a houbami

Bachorové houby mají prokázaný fibrolitický potenciál, produkují komplex celulas, ale vzhledem k jejich nízkým počtům a pomalému růstu se doposud nepodařilo přesně určit podíl na fermentaci celulosy a míru kooperace s ostatními mikroorganismy (Cai et al., 2010). V současnosti máme největší znalosti o kooperacích mezi bakteriálními druhy. Příkladem pozitivních interakcí v bachorovém prostředí můžeme nejčastěji uvést bakterii *Fibrobacter succinogenes*, která velice často kooperuje s ostatními druhy bakterií. Samotný druh nemá schopnost fermentovat pentosy, ale má vysokou xylanolytickou aktivitu. Kombinací s druhem *Butyrivibrio fibrisolvens*, který je schopen fermentovat pentosy dochází k rychlé a internzivní produkci pentos i hexos z rostlinných pletiv. Dalším příkladem je kooperace druhů *Fibrobacter succinogenes* a *Selemonas ruminantium*, ve které podle Sawanona et al., (2011) napomáhá a urychluje štěpení vlákniny v bachoru za zvýšené produkce propionátu. Dále byly prokázány kooperace ve společné kultivaci celulolytických a xylanolytických bakterií a metanogenů s anaerobními houbami, při které došlo ke zvýšení celulolytické a xylanolytické aktivitě (Joblin et al., 1990; Teunissen et al., 1993). V bachorovém prostředí neprobíhají pouze pozitivní interakce, byly prokázány také negativní interakce mezi jednotlivými druhy mikroorganismů. Byly prokázány a popsány u anaerobních hub při snížení přilnavosti na rostlinný materiál vlivem přítomnosti ruminokoků. Ruminokoky produkují protein, který inhibuje fungální celulolytickou aktivitu pomocí vazby na jejich celulasu nebo na celulolytický substrát (Bernalier et al., 1993).

Jednotlivé nutriční interakce mezi celulolytickými a necelulolytickými bakteriemi jsou znázorněny na obrázku 6.



Obrázek 6: Nutriční interakce mezi nejdůležitějšími bachorovými mikroorganismy (Flint, 1997)

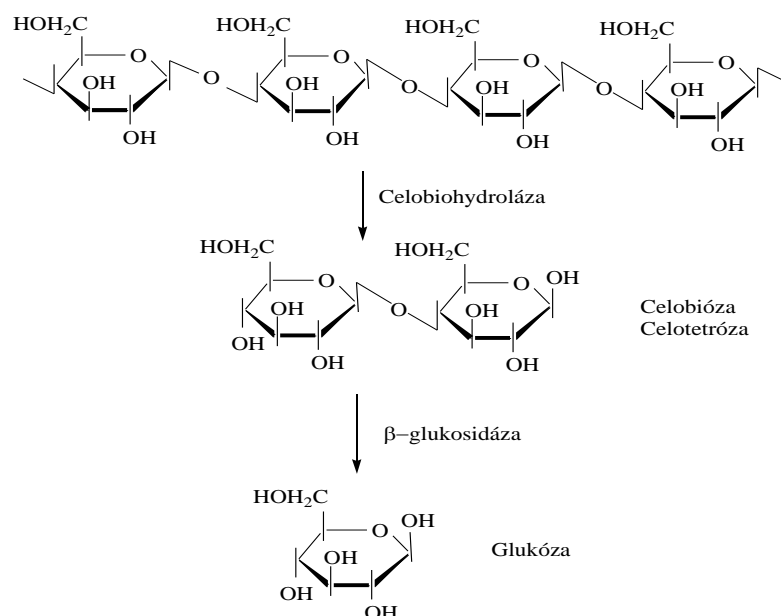
2.5.3. Celulolytické bakterie

Hlavní podíl na štěpení vlákniny mají celulolytické bakterie (Miron et al., 1989; Jun et al., 2007; Kobayashi et al., 2008), mezi nejvýznamnější zástupce jsou považovány především druhy *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus* (Forsberg et al., 1997; Shinkai et al., 2007a; 2009; Cai et al., 2010). Tyto druhy bakterií jsou velice specializované (Li et al., 2015b). Jako zdroj energie a uhlíku využívají disacharidy, trisacharidy a oligosacharidy, které jsou uvolňovány v průběhu hydrolýzy celulosy a hemicelulosy. Ruminokoky fermentují především celulosu a pentosany, ale *Fibrobacter succinogenes* fermentuje jak celulosu, tak i škrob (Sun et al., 2008; Shinkai et al. 2009; Carberry et al., 2012; Kittelmann et al., 2013). Celulolytické bakterie pro svůj růst potřebují řadu B vitamínů, mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem a amoniak. Na dostupnosti těchto živin jsou celulolytické bakterie závislé na ostatních bachorových mikroorganismech, jako jsou prvoci a bachorové houby (Li et al., 2015a).

Vedle těchto hlavních celulólytických bakterií se účastní fermentace celulosy také ostatní bakterie. Rozkladu celulosy se účastní také *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Butyrivibrio Alaktacidigens*, *Eubacterium celulosolvens*, *Celulomonas fimi*, *Clostridium lochheadii* a *Micromonospora propionici*. Všechny tyto druhy kromě *Butyrivibrio fibrisolvens* jsou v bachoru zastoupeny nízkými počty a podle toho se také odráží jejich podíl na hydrolýze celulosy (Dunne et al., 2012). Produkce enzymů schopných štěpit celulosu je u většiny těchto kmenů nízká nebo ji vůbec neprodukuje. Produkce celulas u *Butyrivibria fibrisolvens* je velice variabilní (Kobayashi et al., 2000).

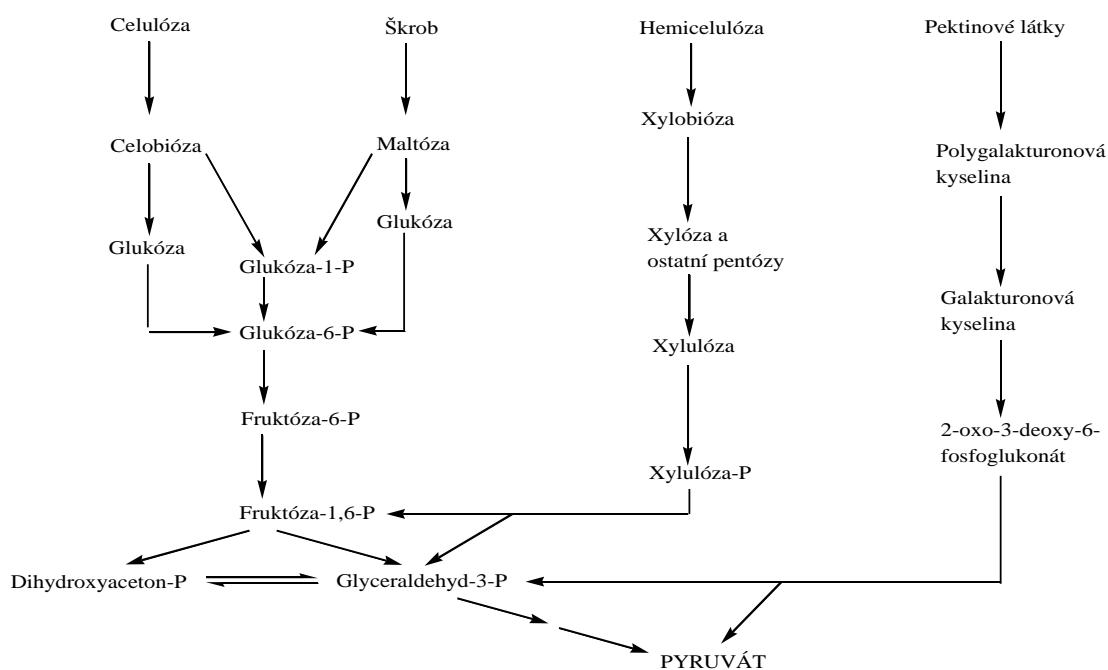
2.5.4. Hydrolýza celulosy

Celulólytické mikroorganismy využívá pro hydrolytické štěpení celulosy různé enzymy, které se od sebe odlišují především vazebným místem a tedy i specifitou působení. Nejprve působí exoglukanasy a endoglukanasy, které hydrolyzují amorfní část celulosy a výsledkem jejich působení je směs celodextrinů (Williams et al., 1994). Následně dochází k působení celobiohydrolasy, která naštěpená místa v této oblasti uvolňuje a umožňuje tak další působení hydrolas. Reakčním produktem celobiohydrolasy je celobiosa. Vzniklá směs celodextrinů a celobiosy je aktivním transportem přenášena do buněk, kde je štěpena působením enzymu β -glukosidasy na glukosu (obrázek 7).



Obrázek 7: Hydrolýza celulosy

Aktivita β -glukosidasy je nepřímě úměrná velikosti štěpu a její aktivita většinou bývá podstatně vyšší než u endoglukanas. Dále metabolické procesy vedoucí k produkci energie ze sacharidů pokračují dalšími kroky, které lze rozdělit na dvě fáze. V první fázi dochází k hydrolyzování polymerů sacharidů na jednoduché rozpustné cukry, které jsou fosforylovány za účasti ATP a štěpeny na glycerinaldehyd-3-fosfát, který je prvotním substrátem pro metabolické procesy, čímž mikroorganismy získávají energie (obrázek 8). Druhou fází je získávání energie ve formě ATP anaerobní produkcí.



Obrázek 8: Hydrolýza strukturních polysacharidů na jednoduché cukry

Jak již bylo zmíněno, tak hlavními zástupci celulolytických bakterií jsou *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus* (Flint et al., 1999; Sun et al., 2008; Shinkai et al. 2009; Carberry et al., 2012; Kittelmann et al., 2013). Ruminokoky tvoří převážnou část celulolytické populace v batoru. Počty ruminokoků dosahují 6 – 10 % celkové bakteriální populace v batoru. *Fibrobacter succinogenes* tvoří menší část batorových celulolytických bakterií, jeho podíl mezi celulolytickými bakteriemi je 10 – 40 %. Enzymový komplex těchto tří druhů celulolytických bakterií je poměrně odlišný. Ruminokoky se vyznačují nízkou produkcí enzymu celobiohyrolasy a jsou důvodem horšího využívání substrátu. Naproti tomu *Fibrobacter succinogenes* je schopen rozkládat mikrokrytalickou celulosu i v případě, když je částečně signifikována (Suen et al., 2011). Všechny druhy těchto bakterií produkují hemicelulasy, které využívají pro přístup k celuloze

v rostlinných pletivech. Produkty, které vznikají působením enzymů hemicelulas celulolytické bakterie vesměs nevyužívají.

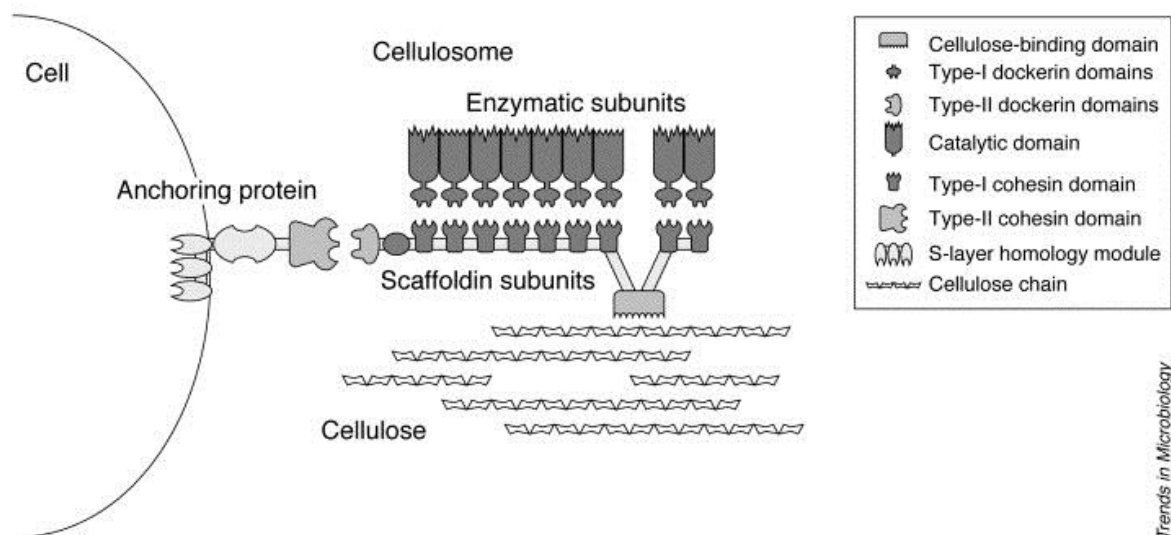
Zajímavostí je z pohledu energetického hlediska fosforolytické štěpení celobiosy. Dochází to vlivem působení enzymu zvaného fosforylosa. Toto štěpení je velice často využíváno druhem *Ruminococcus flavefaciens* (Flint et al., 1994).



Význam štěpení celobiosy spočívá v tom, že při tvorbě glukosa-1-fosfátu vzniká makroergická vazba, při které se nespotřebává ATP. Pro další metabolismus v případě glykolýzy je potřeba na vznik fruktosa-1,6-bifosfátu pouze jedna molekula ATP místo dvou. To znamená, že při fosforolytickém štěpení celobiosy získává jednu molekulu ATP, což jí zvýhodňuje před ostatními druhy bakterií.

Do roku 1983 bylo známo, že celulolytické bakterie mají celulolytické enzymy vázané na svůj buněčný povrch, podrobnější popis však nebyl znám až do té doby, kdy byl z buněčného povrchu anaerobní bakterie *Clostridium thermocellum* izolován multienzymový komplex zvaný celulosom (Stern et al., 2015). Jeho popis byl velice složitý a skládá se z 14 různých polypeptidů s celulasovou a xylanasovou aktivitou. Jeho základ tvoří glykosylovaný protein, který je ukotvený k povrchové S-vrstvě bakteriální buňky pomocí kotvícího proteinu a obsahuje oblast, která váže vlastní enzymy a oblast vázající celulosu. Celá tato struktura je díky kotvícímu proteinu volně otáčivá a umožňuje efektivní využití všech specifických hydrolas na něm vázaných. Enzymy vázané na stavební protein mají katalytickou oblast, která kotví oblast zprostředkovávající vazbu enzymu (Bayer et al., 1998). Celulosom obsahuje celou řadu enzymů, zejména endoglukanas, celobiohydrolas, hemicelulas, pektinas a chitinas (Shoham et al., 1999). V genomu *Clostridium thermocellum* bylo izolováno 71 enzymů obsahující kotvící oblast pro celulosom (Zverlov et al., 2005; Stern et al., 2015).

Přilnutí celulosomu na celulosu je zprostředkováno doménou vázající celulosu na základních stavebním proteinu (obrázek 9). Planární část oblasti vázající celulosu se vlivem vodíkových můstků váže na povrchové řetězce celulosy, čímž je dán základ specifity a síly vazby oblasti vázající celulosu k její krystalické části.



Obrázek 9: Struktura celulosomu bakterie *Clostridium thermocellum* (Shoham et al., 1999)

Bachorové celulolytické bakterie *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus* tvoří na svém povrchu homologické celulosomy jako v případě *Clostridium thermocellum* (Karita et al., 1997; Kirby et al., 1997; Reddy and Morrison, 1998; Flint et al., 1999; Morrison and Miron, 2000; Ohara et al., 2000; Cai et al., 2010; Jeon et al., 2011). Porovnání složení a aktivity enzymového komplexu celulas představuje další krok v poznání procesu degradace vlákniny v trávicím traktu jelenovitých (Sun et al., 2008).

2.6. Metody pro studium mikroorganismů v bachoru

Ještě před 30 lety bylo zřejmé, že bachorové bakteriální druhy, které se izolovaly pomocí klasických kultivačních technik, tvoří pouze zlomek celkové bakteriální populace v bachoru. Objev a zavedení molekulárně genetických metod umožňující detekovat a identifikovat přítomnost i nekultivovaných druhů mikroorganismů, na základě jejich nukleových kyselin potvrdilo domněnku o malém poznání bachorových mikrobiomů. Tento fakt vnesl nový impulz do studia nejen celulolytické mikroflóry, ale i do studia komplexního mikrobiomu zvířat i lidí (Shinkai et al., 2007b; Shinkai et al., 2010). Dnes se odhaduje, že klasickými kultivačními technikami bylo zjištěných pouze 10 – 30 % druhů kolonizující bachor (Kochrginskaya et al., 2001; Koike et al., 2007; Koike et al., 2010). Mezi nejčastěji používané molekulárně genetické metody pro studium mikrobiálního osídlení bachoru se používají denaturační gradientová gelová elektroforéza, kvantitativní polymerázová řetězová reakce a sekvenování nové generace.

2.6.1. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Tato metoda se používá pro určení genetických rozdílů mezi jednotlivými mikroobíálními společenstvy. DGGE je elektroforetická metoda sloužící k identifikaci změn v jednotlivých bázích segmentů DNA. Prvním krokem v tomto procesu je amplifikace úseku 16S rDNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Poté jsou produkty PCR vloženy do polyakrylamidového gelu s lineárně rostoucím gradientem. V denaturujícím gradientovém akrylamidovém gelu je dvouvláknová DNA vystavena zvýšenému denaturačnímu prostředí a tím je postupně rozplétána až na tzv. „domény“, resp. „bandy“. Denaturační prostředí je tvořeno kombinací uniformní teploty a lineárního denaturujícího gradientu tvořeného močovinou a formamidem (Muyzer et al., 1993). Teplota rozplétání těchto „domén“ je sekvenčně specifická. Jestliže je dosaženo teploty rozplétání, začne se dvouvláknová DNA postupně rozplétat. Částečně rozpletená dvouvláknová DNA má v polyakrylamidovém gelu sníženou mobilizační schopnost. Následkem posunů ve schopnosti mobility mají odlišné úseky DNA v akrylamidovém gelu odlišná umístění. Jestliže je takový fragment kompletně denaturován, stává se následně schopnost migrace funkcí velikosti.

2.6.2. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-Time, qPCR)

Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce (*tzv. „v reálném čase“*) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace (Heid et al., 1996). Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných cyclery, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Typická amplifikační křivka má esovitě zakřivený tvar a lze ji rozdělit na 3 části: 1) „background“ fázi kdy je amplifikátu tak málo, že jeho fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot, 2) exponenciální fázi, kdy množství produktu exponenciálně roste (trvá asi 4-8 cyklů) a 3) fázi plató, kdy dochází k saturaci systému, množství amplifikovaného produktu se dále nemění a fluorescenční signál zůstává konstantní. Platí, že čím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze, popř. překročí určitý fluorescenční práh umístěný do této fáze, tím více startovních templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na

počátku reakce (Bustin, 2000; Tichopad et al., 2003; Wong and Medrano, 2005; Belanche et al., 2010; Skillman et al., 2006).

2.6.3. Sekvenování nové generace (Next generation sequencing NGS)

Tyto nové metody používané pro studium genetické variability mikrobiálních společenstev vznikly v posledních dvaceti letech (Fouts et al., 2012; Pope et al., 2012; Kittelmann et al., 2013; Grüninger et al., 2014). Jedná se o metody, které v porovnání s klasickými metodami sekvenování umožňují rychlé a cenově příznivé sekvenování velkého množství vzorků najednou. Využíván je princip paralelizace procesu sekvenování, při kterém dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je produkce obrovského množství výstupních dat s následnou potřebou utřídění a analyzování prostřednictvím bioinformatiky. Všechny metody NGS sekvenování mají stejné obecné schéma. V prvním kroku templátová DNA fragmentována na úseky několika set bází dlouhých. V druhém kroku jsou konce získaných fragmentů enzymaticky zatupeny a napojeny na oligonukleotidy určité sekvence. Ve třetím kroku jsou jednotlivé fragmenty odděleně amplifikovány PCR reakcí (u některých technologií tento krok chybí) a poté paralelně sekvenovány. V tomto paralelním sekvenování se sekvenují milióny sekvencí najednou. Ve čtvrtém kroku jsou získány sekvence o délce 20 – 700 bp. Výtěžek jednoho runu sekvenátoru může být až několik Gb (Mardis, 2008; King and Scott-Horton, 2008; Ansorge, 2009; Metzker, 2010). V současné době existuje celá řada různých NGS technologií, při čemž každá má své výhody a nevýhody. Nejčastěji používanými technologiemi sekvenování nové generace jsou: 454 Roche, Solexa (Illumina), Solid (Applied Biosystems), Ion Torrent (Life Technologies), PacBio (Pacifik Biosciences) a Oxford Nanopore (Claesson et al., 2010; Jünemann et al., 2012; Shokralla et al., 2012; Kong et al., 2014).

3. HYPOTÉZY

Součástí komplexního mikrobiálního ekosystému předžaludku volně žijících přežvýkavců je celulolytická mikrobiální populace. O jejím složení a aktivitě je dostupných málo informací. Celulolytický enzymový komplex v tomto ekosystému je aktivnější a efektivnější u volně žijících přežvýkavců ve srovnání s domácími.

4. CÍL PRÁCE

Popsat zastoupení a složení celulolytické mikrobiální populace podílející se na štěpení vlákniny v bachorovém ekosystému jelena evropského. Izolovat a charakterizovat významné celulolytické enzymy.

5. MATERIÁL A METODY

5.1. Materiál

Chemikálie, substráty a standardy byly získány od společností Lachema, a. s. - Neratovice, P-LAB, s. r. o. - Praha, Sigma Oldrich, s. r. o., Difco, Acros Organics, Amrescho, Pliva-Lachema, a. s. - Brno, Fluka-Labichom a Biorad (USA).

5.1.1. Komerční kity

Kity uvedené v tabulce 2 - byly použity pro izolaci DNA z bacheru a čistých bakteriálních kultur, pro purifikaci DNA fragmentů po PCR reakci, pro sekvenční reakci a pro komplexní sekvenční reakci metodou next generation sequencing (izolace DNA z bacheru, příprava PCR amplionu, příprava knihovny, příprava šablon, sekvenování).

Tabulka 2: Seznam použitých kitů pro práci s DNA

Funkce	Název	Výrobce
Izolace DNA	ZR Fecal DNA Kit TM	Zymo Research
Izolace bakteriální DNA	Dneasy Tissue Kit	QIAGEN
Izolace DNA z batorového obsahu	QIAamp DNA Stool Mini Kit	QIAGEN
Přečišťování PCR produktů	QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Příprava knihovny pro získané amplikony	NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent	New England Biolabs
Příprava knihovny	Agencourt AMPure XP Kit	New England Biolabs
Adaptér pro značení konkrétních vzorků knihovny	Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit	New England Biolabs
Kvantifikace knihovny	Ion Library Quantitation Kit	New England Biolabs
Kvantifikace knihovny	Ion PGM Enrichment Beads	ThermoFisher Scientific
Příprava sekvenčního templátu	Ion PGM HiQ View OT2 Kit	ThermoFisher Scientific
Sekvenování sekvenčních templátů	Ion PGM HiQ View Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
Čip pro sekvenování	Ion 316 Chip Kit v2	ThermoFisher Scientific

5.1.2. PCR primery

Seznam specifických primerů použitých při PCR reakci v této práci je v tabulce 3 – a primerů použitých při qPCR v tabulce 4.

Tabulka 3: Seznam použitých primerů použitých při PCR reakci

Označení	Sekvence (5 – 3)	Zdroj
338 GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGC CCGCCGCCGCCGCCGCACTCCTAC GGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993
FP 341	CCT ACG GGA GGC AGC AC	Muyzer et al., 1993
RP 534	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Muyzer et al., 1993
616 V	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	Loy et al., 2002
630 R	CAKAAAGGAGGTGATCC	Loy et al., 2002
BactBF	GGATTAGATACCCTGGTAGT	Fliegerová et al., 2014
BactBR	CACGACACGAGCTGACG	Fliegerová et al., 2014
D1F2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	Kittelman et al., 2012
NLC2-AF	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	Kittelman et al., 2012

Tabulka 4: Seznam použitých primerů použitých při qPCR reakci

Označení	Sekvence (5 – 3)	Zdroj
926F	AAACTCAAAGGAATTGACGG	De Gregoris et al., 2011
1062R	CTCACRRCACGAGCTGAC	De Gregoris et al., 2011
798F	CRAACAGGATTAGATACCCT	De Gregoris et al., 2011
967R	GGTAAGGTTCTCGCGTAT	De Gregoris et al., 2011
928FirmF	TGAAACTYAAAGGAATTGACG	De Gregoris et al., 2011
1040FirmR	ACCATGCACCACCTGTC	De Gregoris et al., 2011
FS219F	GGTATGGGATGAGCTTGC	Koike et al., 2001
FS654R	GCCTGCCCTGAACTATC	Koike et al., 2001
RA1281F	CCCTAA AAGCAGTCTTAGTTCG	Koike et al., 2001
RA1439R	CCTCCTTGCGGTTAGAACA	Koike et al., 2001
RF154F	GGACGATAATGACGGTACTT	Tajima et al., 2001
RF425R	GCAATCYGAACTGGGACAAT	Tajima et al., 2001

5.1.3. Roztoky pro práci s DNA

10 x	TE pufr	pH 8,0
	TRIS.HCl	0,1 mol.l ⁻¹
	EDTA – Na	10 mmol.l ⁻¹
10 x	TBE pufr	pH 8,2
	EDTA – Na	20 mmol.l ⁻¹
	TRIS.HCl pH = 8	0,4 mol.l ⁻¹
	H ₃ BO ₃	0,9 mol.l ⁻¹
50 x	TAE pufr	pH 8,2
	Tris base	240 g
	0,5 M EDTA	10 ml
	ledová kyselina octová	57,1 ml
	dH ₂ O	do 1000 ml

0,5 M EDTA	pH 8,0	
EDTA Na ₂	186,1 g	
NaOH	~ 20 g (na úpravu pH)	
dH ₂ O	do 1000 ml	
Akrylamid 40%	38 g akrylamidu	
	2 g bisakrylamidu	
Persulfát amonný	100 mg.ml ⁻¹	
Ethidium bromid	zásobní roztok	10 mg.ml ⁻¹
	koncentrace v gelu	0,5 µl.ml ⁻¹
10 x DNA vzorkový pufr	bromfenolová modř	250 mg
	Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
	Glycerol	60 ml
	EDTA	10 mM
	H ₂ O	do 100 ml

5.1.4. Kultivační média

5.1.4.1. Médium M10 pro kultivaci anaerobních bakterií

Pro anaerobní izolaci a kultivace bakterií bylo použito médium M10 připravené dle Caldwell a Bryanta (1966) :

odstředěná bachorová tekutina	100 ml
kvasničný autolyzát	0,5 g
trypton	2 g
roztok heminu	10,0 ml
minerální roztok I	38,0 ml
minerální roztok II	38,0 ml
směs těkavých mastných kyselin	3,1 ml
resazurin (0,1%)	0,5 ml
roztok vitamínů	1,0 ml

roztok mikroprvků	1,0 ml
cystein	0,5 g
NaHCO ₃	4,0 g
růstový substrát	4,0 g

Roztoky pro médium M10:

Minerální roztok I (100 ml)

NaCl	1,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2 g
KH ₂ SO ₄	0,6 g
CaCl ₂	0,12 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g

Minerální roztok II (100 ml)

KH ₂ PO ₄	0,6 g
---------------------------------	-------

Roztok vitamínů (100 ml)

B1 thiamin	100 mg
B2 riboflavin	100 mg
B6 pyridoxin	100 mg
nikotinamid	100 mg
kys. pantothenová	100 mg
biotin	100 mg
K 1	10 ml
PAB k. aminobenzoová	100 mg

Roztok mikroprvků (100 ml, pH 7)

NiCl ₂	38 mg
H ₃ BO ₄	50 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,65 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	75 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	38 mg

CoCl ₂ .6H ₂ O	38 mg
KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	15 mg
Chelaton 1	15 mg
NaOH	38 mg

Směs těkavých mastných kyselin

octová	170 ml
propionová	60 ml
máselná	60 ml
valerová	10 ml
isomáselná	10 ml
isovalerová	10 ml
metylmáselná	10 ml
fenylpropionová	100 mg

Bachorová tekutina byla odebírána z bachoru jelenů ihned po ulovení (Obora Aglája – Dobříš nebo volnost Dolní Krupá), vylisována a sterilizována (1 hod., 120 °C, 1 atm). Před použitím byla odstředěna (2 hod., 15 000 min⁻¹), (Lewett, 1978). Medium obsahovalo 10 % (w/w) bachorové tekutiny.

Růstovým substrátem byla glukosa nebo celobiosa nebo hemicelulosa nebo xylan nebo carboxymethylcelulosa nebo celulosa powder. Médium bylo připraveno anaerobně, po úpravě pH na 7,0 – 7,5, a po povaření bylo médium chlazeno a probubláváno plynnou fází o složení CO₂ – 80 %, N₂ – 10 % a H₂ – 10 %. Po ochlazení na přibližně 30 °C byl přidán NaHCO₃, po jeho rozpuštění cystein a růstový substrát. Následovala úprava pH na 6,8 – 7,0. Poté bylo médium za stálého probublávání plynnou fází (cca 15 minut) rozplňováno po 10 ml do 25 ml nádob. Médium bylo sterilováno autoklávováním při 121 °C po dobu 25 minut.

5.1.4.2. Médium Cellulose Medium for Ruminococcus pro kultivaci anaerobních bakterií

Pro anaerobní izolaci a kultivace bakterií bylo použito médium Cellulose Medium for *Ruminococcus* připravené dle Latham and Wolin, (1978):

kvasničný autolyzát	0,1 g
triptikáza (BBL)	0,5 g
minerální roztok I	15,0 ml
minerální roztok II	15,0 ml

směs těkavých mastných kyselin	0,1 ml
resazurin (0,1%)	0,1 ml
cystein	0,05 g
Na ₂ CO ₃ , 8 % roztok	5,0 ml
růstový substrát	0,2 g

Roztoky pro médium *Ruminococcus*:

Minerální roztok I (100 ml)

NaCl	1,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2 g
KH ₂ SO ₄	0,6 g
CaCl ₂	0,12 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g

Minerální roztok II (100 ml)

KH ₂ PO ₄	0,6 g
---------------------------------	-------

Směs těkavých mastných kyselin

octová	170 ml
propionová	60 ml
máselná	60 ml
valerová	10 ml
isomáselná	10 ml
isovalerová	10 ml
metylmáselná	10 ml
fenylpropionová	100 mg

Růstovým substrátem byla celulosa powder. Médium bylo připraveno anaerobně, po úpravě pH na 7,0 – 7,5 a po povaření bylo médium chlazeno a probubláváno plynou fází o složení CO₂ – 80 %, N₂ – 10 % a H₂ – 10 %. Po ochlazení na přibližně 30 °C byl přidán Na₂CO₃, po jeho rozpuštění cystein a růstový substrát. Následovala úprava pH na 6,8 – 7,0. Poté bylo médium za stálého probublávání plynou fází (cca 15 minut) rozplňováno po 10 ml do 25 ml nádob. Médium bylo sterilováno autoklávováním při 121 °C po dobu 25 minut.

5.1.4.3. Médium M10 pro kultivaci anaerobních bakterií

Pro anaerobní kultivace bakterií bylo použito modifikované médium PYG Šimůnek:

kvasničný autolyzát	10 g
trypton	5 g
pepton	8 g
glukosa	8 g
celobiosa	1 g
maltosa	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
roztok heminu	10,0 ml
minerální roztok I	20,0 ml
minerální roztok II	20,0 ml
vitamín K roztok	0,3 ml
resazurin (0,1%)	0,5 ml
tween 80	0,1 ml
cystein	0,5 g

Minerální roztok I (100 ml)

NaCl	1,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2 g
KH ₂ SO ₄	0,6 g
CaCl ₂	0,12 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g

Minerální roztok II (100 ml)

KH ₂ PO ₄	0,6 g
---------------------------------	-------

Médium bylo připraveno anaerobně, po úpravě pH na 7,0 – 7,5 a po povaření bylo médium chlazeno a probubláváno plynou fází o složení CO₂ – 80 %, N₂ – 10 % a H₂ – 10 %. Po ochlazení na přibližně 30 °C byl přidán cystein, roztok vitamínu K. Následovala úprava pH na 6,8 – 7,0. Poté bylo médium za stálého probublávání plynou fází (cca 15 minut) rozplňováno po 10 ml do 25 ml nádob. Médium bylo sterilováno autoklávováním při 121 °C po dobu 25 minut.

5.1.5. Použité roztoky při stanovení enzymových aktivit

Fosfátový pufr 100mM (pH 6):	15,6 g.l ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O
Roztok BSA	
Roztok Bradford (200 ml): 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, rozpuštěno v 50 ml etanolu, bylo přidáno 100 ml 85 % H ₃ PO ₄	
25% kyselina trichloroctová	25 + 75 vody
0,5 N NaOH:	20 g.l ⁻¹
Roztoky pro SDS-elektroforézu	
200 mM TRIS:	24,22 g.l ⁻¹
50 mM CaCl ₂ s 2,5 % agaru	pH 8.0
0,2% PNP-beta-D-glukopyranosid:	2 mg.l ⁻¹
2% Na ₂ CO ₃	20 g.l ⁻¹
0,3 M ZnSO ₄ :	86,262 g.l ⁻¹
0,3 M Ba(OH) ₂ :	94,644 g.l ⁻¹
PNP cellobiosid:	1 mg.ml ⁻¹
PNP glykosid	2 mg.ml ⁻¹
1M NaCl:	58 g.l ⁻¹
0,2% kongo červeň:	2 g.l ⁻¹
0,5% substrát	5 g.l ⁻¹ (CMC, xylan)
1% tributyrin:	1 ml do 100 ml H ₂ O
50mM CaCl ₂ :	5,55 g.l ⁻¹
2,5% agar:	25 g.l ⁻¹

5.1.6. Použité přístroje

Vortex VELP Scientifica (Itálie)

Vortex P-Lab, Scientific Instruments (CZ)

Autokláv PS 20A (Chirana Praha, CZ)

Vytápěné míchadlo 1000, Jenway (UK)

Odstředivka Hawk IE/05, MSE (UK)

Mikroodstředivka Force F, Denver Instrument (USA)

Zdroj na ELFO PowerPac Basic, Biorad (USA)

Cyklický vodní ohříváč DC10, HAAKE (Německo)

Váhy L42D, Sartorius Laboratory (Německo)

UV Transiluminátor TF-20M, Bioblock Scientific (Francie)

UV box, Herold GmbH (Německo)
PCR termocykler T-personel Combi, Biometra (Německo)
Sekvenátor ABI Prism 3100 Avant (UK)
pH metr Jenway 3310 (UK)
PCR termocykler MX 3005TM, Stratagene (USA)
Fotodokumentační systém GelDocTM XR^T, Biorad (USA)
Software Image/Lab verze 2.0, Biorad (USA)
DGGE systém Protean II xi Cell, Biorad (USA)
Water Purification System Direct – Q_{uv3}, Millipore (USA)
Vortex Zx³ VELP (Scintifica, Itálie)
Vařič Eta 2109 000 (CZ)
Zdroj na ELFO PowerPac 1000 (BioRad, USA)
Fotodokumentační systém GelDocTMXR⁺ (Biorad)
Softwer Image Lab verze 2.0 (Biorad)
Ultrazvukový desintegrátor
pH metr 3310 Jenway (Velká Británie)
Autokláv PS 20A (Chirana Praha, CZ)
Termostat TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, CZ)
Mrazicí box VT327 (Vestfrost, Německo)
GraphPad instat ver 3.0 (GraphPad software, USA)
spektrometr Thermo spectronic Biomate 5 (Thermo Spectronic, ChromSpec, UK),
Sunrise Tecan (Schoeller)
vodní lázeň Julabo TW 12 (Německo)
odstředivka MLW K 23D Janetzki (Německo), MLW K 24D Janetzki (Německo),
Hawk 15/05, MSE (UK)
analytické váhy L420 D Sartorius laboratory
mikropipety Nichipet EX Nichiryō (Japonsko), Transferpette (Japonsko)
špičky Neptune
termostat TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, CZ)
sekvenátor Ion TorrentTM – Personal Genome Machine s příslušenstvím
MiniProtean (Bio-Rad, USA)
Bio-Rad Protean IEF Cell (Bio-Rad, USA)

5.2. Metody

5.2.1. Odběr vzorků

Vzorky byly odebírány v dvou lokalitách: ve volném chovu v oblasti Strážného na Šumavě a v oboře Aglája nedaleko Dobříše. Vzorky byly odebírány z bachorů jelenů ulovených odstřelem a exkrementů sbíraných v okolí krmících zařízení v období lovu od 15.11. do 15.1. od roku 2012 do roku 2014 v době vegetačního klidu dřevin. Vzorky od domácího skotu byly odebírány při porážce. Bylo odebráno 35 vzorků z bachoru jelení zvěře ve volném chovu zvěře, 33 vzorků z bachoru jelení zvěře v oborním chovu, 22 vzorků z bachoru dančí zvěře v oborním chovu, 1 vzorku z bachoru srnčí zvěře z volného chovu, 5 vzorků z bachoru tura domácího, 4 vzorky z bachoru ovce, 15 vzorků exkrementů ve volném chovu, 12 vzorků exkrementů v oborním chovu (tabulka 5). Vzorky byly odebírány do sterilních plastových vzorkovnic o objemu 25 ml a byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -60 °C.

Tabulka 5: Seznam a označení jednotlivých odebraných vzorků použitých ve studii

Pořadí	Označení	Pohlaví	Stáří	Odběr	Místo sběru	Navážka	Rok sběru
1	1	jelen	3	bachor	volnost	156	2012
2	2	jelen	4	bachor	volnost	140	2012
3	3	laň	5	bachor	volnost	142	2012
4	4	laň	3	bachor	volnost	138	2012
5	5	laň	3	bachor	volnost	164	2012
6	6	laň	3	bachor	volnost	148	2012
7	7	laň	2	bachor	volnost	147	2012
8	8	laň	3	bachor	volnost	142	2012
9	9	laň	6	bachor	volnost	145	2012
10	10	laň	5	bachor	volnost	160	2012
11	11	laň	3	bachor	volnost	160	2012
12	12	laň	2	bachor	volnost	155	2012
13	13	kolouch	1	bachor	volnost	160	2012
14	14	kolouch	1	bachor	volnost	138	2012
15	15	kolouch	1	bachor	volnost	151	2012
16	16	kolouch	1	bachor	volnost	148	2012
17	17	kolouch	1	bachor	volnost	143	2012
18	18	kolouch	1	bachor	volnost	156	2012
19	19	kolouch	1	bachor	volnost	148	2012
20	20	kolouch	1	bachor	volnost	165	2012
21	21	kolouch	1	bachor	volnost	168	2012
22	22	jelen	-	bachor	volnost	162	2013
23	23	jelen	-	bachor	volnost	151	2013
24	24	laň	-	bachor	volnost	160	2013
25	25	laň	-	bachor	volnost	163	2013
26	26	laň	-	bachor	volnost	156	2013
27	27	laň	-	bachor	volnost	161	2013
28	28	laň	-	bachor	volnost	146	2013
29	29	laň	-	bachor	volnost	159	2013
30	30	laň	-	bachor	volnost	151	2013
31	31	laň	-	bachor	volnost	151	2013
32	32	laň	-	bachor	volnost	158	2013
33	33	laň	-	bachor	volnost	158	2013
34	34	laň	-	bachor	volnost	155	2013
35	35	laň	-	bachor	volnost	144	2013
36	36	kolouch	-	bachor	obora	141	2012
37	37	jelen	3	bachor	obora	141	2012
38	38	jelen	7	bachor	obora	146	2012
39	39	jelen	2	bachor	obora	151	2012

40	40	jelen	2	bachor	obora	151	2012
41	41	jelen	10	bachor	obora	145	2012
42	42	laň	5	bachor	obora	148	2012
43	43	laň	5	bachor	obora	145	2012
44	44	laň	6	bachor	obora	145	2012
45	45	laň	4	bachor	obora	147	2012
46	46	kolouch	6 m	bachor	obora	152	2012
47	47	kolouch	9 m	bachor	obora	145	2012
48	48	kolouch	6 m	bachor	obora	148	2012
49	49	kolouch	8 m	bachor	obora	141	2012
50	50	kolouch	8 m	bachor	obora	152	2012
51	51	laň	-	bachor	obora	145	2013
52	52	laň	-	bachor	obora	148	2013
53	53	kolouch	-	bachor	obora	160	2013
54	54	kolouch	-	bachor	obora	160	2013
55	55	kolouch	-	bachor	obora	144	2013
56	56	kolouch	-	bachor	obora	156	2013
57	57	jelen	-	bachor	obora	174	2014
58	58	jelen	-	bachor	obora	176	2014
59	59	jelen	-	bachor	obora	152	2014
60	60	jelen	-	bachor	obora	146	2014
61	61	laň	-	bachor	obora	152	2014
62	62	laň	-	bachor	obora	167	2014
63	63	laň	-	bachor	obora	159	2014
64	64	kolouch	-	bachor	obora	157	2014
65	65	kolouch	-	bachor	obora	152	2014
66	66	kolouch	-	bachor	obora	154	2014
67	67	kolouch	-	bachor	obora	165	2014
68	68	kolouch	-	bachor	obora	152	2014
69	69	daněk	-	bachor	obora	186	2014
70	70	daněk	-	bachor	obora	152	2014
71	71	daněk	-	bachor	obora	147	2014
72	72	daněk	-	bachor	obora	155	2014
73	73	daněk	-	bachor	obora	144	2014
74	74	daněk	-	bachor	obora	147	2014
75	75	daněla	-	bachor	obora	154	2014
76	76	daněla	-	bachor	obora	153	2014
77	77	daněla	-	bachor	obora	159	2014
78	78	daněla	-	bachor	obora	159	2014
79	79	danče	-	bachor	obora	180	2014
80	80	danče	-	bachor	obora	153	2014

81	81	danče	-	bachor	obora	182	2014
82	82	danče	-	bachor	obora	160	2014
83	83	danče	-	bachor	obora	157	2014
84	84	danče	-	bachor	obora	150	2014
85	85	danče	-	bachor	obora	164	2014
86	86	danče	-	bachor	obora	170	2014
87	87	danče	-	bachor	obora	156	2014
88	88	danče	-	bachor	obora	155	2014
89	89	danče	-	bachor	obora	176	2014
90	90	danče	-	bachor	obora	146	2014
91	91	srna	-	bachor	volnost	152	2013
92	92	kráva	-	bachor	chov	156	2013
93	93	ovce	-	bachor	chov	393	2017
94	94	ovce	-	bachor	chov	372	2017
95	95	ovce	-	bachor	chov	372	2017
96	96	ovce	-	bachor	chov	413	2017
97	97	kráva	-	bachor	chov	394	2017
98	98	kráva	-	bachor	chov	420	2017
99	99	kráva	-	bachor	chov	400	2017
100	100	kráva	-	bachor	chov	377	2017
101	101	kolouch	-	exkrementy	volnost	145	2012
102	102	kolouch	-	exkrementy	volnost	146	2012
103	103	kolouch	-	exkrementy	volnost	142	2012
104	104	kolouch	-	exkrementy	volnost	148	2012
105	105	kolouch	-	exkrementy	volnost	152	2012
106	106	laň	-	exkrementy	volnost	145	2012
107	107	laň	-	exkrementy	volnost	141	2012
108	108	laň	-	exkrementy	volnost	150	2012
109	109	laň	-	exkrementy	volnost	148	2012
110	110	laň	-	exkrementy	volnost	152	2012
111	111	laň	-	exkrementy	volnost	148	2012
112	112	jelen	-	exkrementy	volnost	149	2012
113	113	jelen	-	exkrementy	volnost	139	2012
114	114	jelen	-	exkrementy	volnost	148	2012
115	115	jelen	-	exkrementy	volnost	150	2012
116	116	jelen	-	exkrementy	obora	149	2012
117	117	jelen	-	exkrementy	obora	150	2012
118	118	jelen	-	exkrementy	obora	145	2012
119	119	laň	-	exkrementy	obora	146	2012
120	120	kolouch	-	exkrementy	obora	148	2012
121	121	laň	-	exkrementy	obora	148	2012

122	122	laň	-	exkrementy	obora	146	2012
123	123	kolouch	-	exkrementy	obora	149	2012
124	124	laň	-	exkrementy	obora	150	2012
125	125	jelen	-	exkrementy	obora	148	2012
126	126	kolouch	-	exkrementy	obora	143	2012
127	127	kolouch	-	exkrementy	obora	148	2012

5.2.2. Charakteristika lokality volného chovu jelenů v oblasti Strážného

Rozloha této lokality je 3500 ha. Zastoupení dřevin: 70 % jehličnatých a 30 % listnatých dřevin. Jelení zvěř se v průběhu roku nepřikrmuje, pouze v období nouze, které začíná od listopadu do března. V této době se zvěř přikrmuje objemnými, jadrnými a dužnatými krmivy. Do těchto krmiv, která jsou předkládána zvěři patří seno, vojtěška, ječnem, oves, krmná řepa a mrkev.

5.2.3. Charakteristika lokality oborního chovu jelenů v oboře Aglája u Dobříše

Rozloha obory je 490 ha. Zastoupení dřevin: 40 % jehličnatých a 60 % listnatých dřevin. Zvěř se v této lokalitě přikrmuje po celý rok objemnými, jadrnými i dužnatými krmivy. Nejčastěji předkládaná krmiva jsou seno, vojtěška, ječmen, oves, pšenice, řepkové pokrutiny a krmná řepa.

5.3. *Molekulárně-genetický screening zastoupení celulolytických mikroorganismů v bachorovém obsahu jelena evropského pomocí molekulárně-genetických metod*

5.3.1. Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí komerčních kitů QIAamp DNA Stool Mini Kit nebo ZR Fecal DNA KitTM dle návodu výrobce. Koncentrace a čistota získané DNA byla kontrolována vizuálně pomocí horizontální agarosové elektroforézy. Gel na elektroforézu byl připraven jako 1,2 % roztok agarosy v TBE pufru. Vzorke byly na gel dávkovány ve směsi se vzorkovým pufrům v poměru 2:1 (Sambrok et al., 1989).

5.3.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) – Amplifikace úseku 16S rDNA

Namnožení vybraných úseků 16S rDNA bylo provedeno pomocí metody PCR. Reakční směs byla připravena v boxu ošetřeném UV světlem.

Reakční směs obsahovala:

DNA 1 μ l

Forward primer 338 GC	1 μ l
Revers primer RP 534	1 μ l
PCR readymix	15 μ l
PCR H ₂ O	12 μ l

Pro PCR byl v termocykleru použit následující program: denaturace 5 minut při 94 °C, 36 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 94 °C, 20 sec přisednutí primerů při 61 °C a 40 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (7 minut při 72 °C).

5.3.3. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Denaturační gradientová gelová elektroforéza byla použita ke sledování bakteriální populace trávicího traktu jelena lesního. Denaturační gradientová gelová elektroforéza je elektroforetická metoda, která dokáže rozlišit fragmenty DNA stejné délky lišící se v alespoň jedné bázi. V denaturačním gradientovém akrylamidovém gelu je dvouvláknová DNA vystavena rostoucímu denaturačnímu gradientu a disociuje („taje“) v oddělených oblastech. Rozvolněním DNA se snižuje její pohyblivost v polyakrylamidovém gelu. Denaturační prostředí je tvořeno kombinací uniformní teploty (60 °C) a lineárního denaturujícího gradientu tvořeného močovinou a formamidem (Muyzer et al., 1993).

Gradient je tvořen postupným mísením dvou roztoků o různé denaturační síle. Gel se lije do sestavených desek a nechá se polymerovat ve vodorovné poloze alespoň 1 hodinu. Použité roztoky udává tabulka 6. Gel je na korpusu ponořen do lázně temperované na 60 °C. 16S rDNA byla amplifikována pomocí reakce PCR, která je uvedena výše. Získaný produkt byl nanesen na gel.

Vlastní elektroforéza probíhá po dobu 18 hodin za konstantního napětí 55 V. Po skončení je gel barven 30 minut v roztoku SYBR Green I (Sigma-Aldrich, ČR). Následně je gel vyfocen a analyzován ve fotodokumentačním systému GelDocTM XR^T od firmy Biorad.

DGGE gel byl analyzován softwarem Bionumerics v. 7.2.1 pro normalizaci gelu, detekci pásem a výpočet diverzity a vzdálených matic. Dendrogram byl vytvořen pomocí UPGMA s Pearsonovou korelací.

Tabulka 6: Roztoky pro přípravu DGGE gelů

Stupeň denaturace	35 %	60 %
40 % akrylamid	5,56 ml	5,56 ml
50x TAE	0,5 ml	0,5 ml
Formamid	3,5 ml	6 ml
Močovina	3,675 g	6,3 g
H ₂ O	12,25 ml	9,5 ml
TEMED	20 µl	20 µl
Persulfát amonný	200 µl	200 µl

5.3.4. Sekvenování

Vybrané fragmenty DNA byly identifikovány následujícím způsobem: DNA byla vyříznuta z gelu sterilním skalpelem, jeden mikrolitr roztoku obsahující fragmenty gelu byl amplifikován způsobem popsaným výše (amplifikace úseku 16S rDNA – byly použity primery 341FP + 534RP). Amplifikační proces byl zkontrolován pomocí agarózové elektroforézy za přítomnosti DNA markeru 200 až 1500 pb (Top-Bio, CZ). Získaný produkt byl přečištěn kitem QIAquick PCR Purification Kit. Sekvenování bylo provedeno ve společnosti SEQme (CZ).

Sekvence ve formátu *.ab1 byly zkontrolovány a upravené v programu Geneious v10.2.3. Sekvence získané pomocí forward a reverz primeru byly u každého vzorku srovnané pomocí alignovacího algoritmu geneious s defaultními parametry. Získaná konsenzní sekvence byla vyexportována a identifikován pomocí programu SEED2 a databází RDP a NCBI (Kearse et al., 2012; Větrovský and Baldrian, 2013).

5.3.5. Příprava agarózového gelu

Agarózová elektroforéza byla použita pro zjištění čistoty, formy a koncentrace izolované DNA a PCR produktů. Byl připraven 1,2 % agarózový gel v TBE tlumivém roztoku (Maniatis et al., 1982). Elektroforéza probíhala 1 hodinu při napěťové spádu 8 – 10 V/cm. Po skončení byla DNA barvena etidium bromidem o koncentraci 0,5 µg/ml (Sambrook et al., 1989). DNA byla vizualizována a dokumentována ve fotodokumentačním systému od firmy Bio-Rad. Stejný systém byl použit i pro zjišťování velikostí DNA fragmentů porovnáním

s molekulovými standardy. Pro agarózové elektroforézy byl použit DNA marker 200 až 1500 pb (Top-Bio, CZ).

5.3.6. Next generation sequencing

Sekvenování nové generace bylo provedeno na základě posloupnosti následujících kroků. Po izolaci DNA z bachorového obsahu kitem QIAamp DNA Stool Mini Kit. Následovala příprava PCR amplikonu. Oblast bakterií V4-V5 regionu 16S rRNA a oblast hub ITS region (18S – 28S) se amplifikovala podle následující reakce:

DNA	1 µl
Forward primer	1 µl
Revers primer	1 µl
One Taq Mater Mix (NEB, USA)	15 µl
PCR dH ₂ O	12 µl

Pro amplifikaci bakterií PCR byl v termocykleru použit následující program: denaturace 10 minut při 95 °C, 45 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 95 °C, 30 sec přisednutí primerů při 57 °C a 30 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (7 minut při 72 °C) (Fliegerová et al., 2014).

Pro amplifikaci hub PCR byl v termocykleru použit následující program: denaturace 5 minut při 94 °C, 30 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 94 °C, 30 sec přisednutí primerů při 52 °C a 30 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (5 minut při 72 °C) (Kittelman et al., 2012).

Amplikony byly purifikovány pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit a jejich eluce byla stanovena na 35 µl. Koncentrace byla stanovena spektrofotometrem metodou NanoDrop. Dále pro získané amplikony byla připravena knihovna, při které se na získané amplikony ligují sekvenační adaptéry. Přibližně 100 ng DNA bylo použito pro přípravu knihovny pomocí NEBNext® Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent, dle návodu výrobce. Pomocí kitu Ion Xpress Barcode Adapters, dle návodu výrobce byly označeny jednotlivé vzorky a dále jednotlivé knihovny se kvantifikovali qPCR postupem pomocí Ion Library Quantitation Kit, dle návodu výrobce, a promícháním bylo získáno 25 µl směsi s ekvimolární koncentrací 26 pM pro každý vzorek. Dále byly připraveny zesílené sekvenční tepláty pro sekvenování pomocí Ion PGM HiQ View OT2 Kit, dle návodu výrobce pomocí zařízení One Touch 2. Vytvořený sekvenční templát z předchozího kroku byla sekvenována na platformě Ion Torrent PGM pomocí čipu Ion 316 Chip Kit v2. Získaná data z Ion Torrent

PGM byly získány ve formátu .fastq, který je kombinací kvalitativní informace (q) a sekvencemi (fasta). Vzniklá data byla zpracována pomocí softwaru QIIME 1.9.1., podle požadavku uživatele: boxploty zatoupení jednotlivých druhů mikroorganismů nebo skupin v jednodolných vzorcích, alfa a beta diverzita a analýza PCoA (Caporaso et al., 2010; Fliegerova et al., 2014).

5.3.7. Real – Time - qPCR

Sledování počtu celkových bakterií a jednotlivých subpopulací bylo provedeno metodou real-time PCR.

Metoda je založena na klasické polymerázové řetězové reakci PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu, Základní podmínkou je přítomnost fluorescenční barvy, která se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Data jsou sbírána během celého PCR procesu na termocyklerech s optikou umožňující detekci fluorescence (Heid et al. 1996; Bustin, 2000; Tichopad et al., 2003; Wong and Medrano, 2005; Skillman et al., 2006; Belanche et al., 2010).

Reakční směs byla připravena v boxu ošetřeném UV světlem a reakční prostředí obsahovalo:

DNA	1 µl
Primer forward 10 mM	0,5 µl
Primer revers 10 mM	0,5 µl
Xceed mix	10 µl
PCR dH ₂ O	8 µl

Na analýzu bakteriálních populací byly použity následující dvojice primerů s teplotními profily podle uvedených autorů prací: Celkové bakterie: 926F + 1062R (De Gregoris et al., 2011); kmen *Bacteroides*: 798F + 967R (De Gregoris et al., 2011); kmen *Firmicutes*: 928FirmF + 1040FirmR (De Gregoris et al., 2011); druh *Fibrobacter succinogenes*: FS219F + 654R (Koike et al., 2001); druh *Ruminococcus albus*: RA1281F + RA1439R (Koike et al., 2001); druh *Ruminococcus flavefaciens*: RF154F + RF425R (Tajima et al., 2001).

Externí standardy použité pro PCR amplifikaci v reálném čase byly připraveny s použitím sériového zředění DNA izolované ze známého počtu buněk z kmenů *Fibrobacter succinogenes* (S85), *Ruminococcus flavefaciens* (FD-1) a *Ruminococcus albus* (7).

5.4. Izolace čistých kultur celulytických mikroorganismů kultivačními technikami anaerobní mikrobiologie a jejich biochemická a sekvenanční identifikace pomocí 16S rDNA. Ověření biochemické aktivity vybraných kmenů při štěpení různých typů celulosy, zejména aktivity celulasy (EC 3.2.1.4), endoglukanasy (EC 3.2.1.6) a celobiohydrolasy (EC 3.2.1.91)

5.4.1. Izolace celulytických bakterií

Izolace byly prováděny za anaerobních podmínek v rukavicovém boxu s anaerobní atmosférou a metodou ROLL-TUBE (Hugate, 1950), na agarových živných půdách M10 s různými substráty (celobiosa, karboxymethylcelulosa, glukosa, filtrační papír Whatman a xylan), agarových živných půdách medium Celulose for *Ruminococcus* a na agarových živných půdách modifikovaného PYG media. Po 24 – 48 (120) hodinové kultivaci se narostlé kolonie přeočkují do tekutého média M10 s daným substrátem, Celulose for *Ruminococcus* a modifikované PYG. Po nárůstu budou z izolátů připraveny stěry a obarveny metodou podle Grama (Ogimoto and Imai, 1981). K dlouhodobému ukládání budeme kultury zmrazovat s přidavkem 20 % glycerinu a uchovávat při teplotě -60°C .

5.4.2. Kultivace celulytických bakterií

Kultivace čistých a směsných kultur mikroorganismů byly prováděny následujícími způsoby. Kultivace v penicilinkách pod anaerobní atmosférou v objemech 20 ml umístěnými v termostatu, v infuzních (NTS) láhvích o objemech 100, 300 nebo 500 ml s gumovými zátkami s převlečeným hliníkovým víčkem v termostatu, ve zkumavkách Hungate o objemu 10 ml v termostatu a na agarových plotnách v Petriho miskách umístěných v anaerostatu.

5.4.3. Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí komerčního kitu Qiagen – Dneasy Tissue Kit, dle návodu výrobce.

5.4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR) – Amplifikace úseku 16S rDNA

Namnožení vybraných úseků 16S rDNA bylo provedeno pomocí metody PCR. Reakční směs byla připravena v boxu ošetřeném UV světlem. Reakční směs obsahovala:

DNA	1 μl
Forward primer 616 V	1 μl
Revers primer 630R	1 μl

PCR readymix	15 μ l
PCR H ₂ O	12 μ l

Pro PCR byl v termocykleru použit následující program: denaturace 1 minut při 94 °C, 30 amplifikačních cyklů (40 sec denaturace při 94 °C, 40 sec přisednutí primerů při 52 °C a 90 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (10 minut při 72 °C) (Loy et al., 2002).

5.4.5. Sekvenování

Amplikon genu byl získán za použití primerů 616V a 630R za podmínek PCR uvedených výše (Loy et al., 2002). Amplifikační proces byl zkontrolován pomocí 1,5% agarózové elektroforézy (115 V, 40 min) za přítomnosti DNA markeru 200 až 1500 pb (Top-Bio, CZ). Poté byly amplikony přečištěny pomocí komerčního kitu QIAquick PCR Purification Kit, dle návodu výrobce. Sekvenování bylo provedeno ve společnosti SEQm (CZ). Sekvence ve formátu *.ab1 byly zkontrolovány a upravené v programu Geneious v10.2.3. Sekvence získané pomocí forward a reverz primeru byly u každého vzorku srovnány pomocí alignovacího algoritmu geneious s defaultními parametry. Získaná konsenzní sekvence byla porovnána s internetovou databází GenBank NCBI se sekvencemi příbuzných druhů bakterií v softwaru BLAST. Výsledná zkontrolovaná sekvence nového druhu (cca 1500 pb) byla uložena v databázi GenBank pomocí systému BankIt <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>>.

Sekvence byly alignované pomocí defaultního algoritmu programu Geneious ("global alignment with free end gaps", "Cost matrix: 65 % similarity") s automatickým určením správné orientace sekvencí (Kearse et al., 2012). Pro výpočet distanční matice sekvencí byl použitý model "Tamura-Nei" a následně byl vytvořený stromek metodou UPGMA. Pro výpočet spolehlivosti větví byla data 1000x resamplována ("bootstrapping"). Grafické úpravy stromku (font a barva písma, rozměry, atd.) byly provedené v programu MEGA (Tamura et al., 2013; Kumar et al., 2016).

5.4.6. DNA – stanovení příbuznosti bakterií

Příbuznost bakterií byla hodnocena pomocí hybridní techniky DNA-DNA (DDH). DNA bakterie s vysokou molekulovou hmotností pro porovnání kmenů pro DDH byly získány na základě protokolu (Gevers et al., 2001). Na základě protokolů (Goris et al., 1998; Cleenwerck et al., 2002) byla použita metoda mikrodestiček pro stanovení obsahu G + C bází. Pro výpočet hybridizační teploty byla použita metoda HPLC (Killer et al., 2014). Byly provedeny tři nezávislé měření a výsledná hodnota byla vypočtena jako aritmetický průměr.

5.4.7. Fylogenetické studie

Fylogenetické vztahy mezi kmeny byly hodnoceny pomocí stromků založených na 16S rRNA. Pro konstrukci stromků byly z databáze NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> získány sekvence pouze typových kmenů patřících k určité bakterii a použity pro ClustalW alignment v Geneious v7.1.7 software. Nesrovnalosti v sekvencích byly upraveny vyloučením špatně vyrovnaných pozic a rozdílných oblastí pomocí serveru Gblocks (Castresana 2000). Pro vytvoření fylogenetických stromů byly použity metody bootstrap (1000 replikací), Kimura 2-parametrický model, nearest-neighbor-interchange heuristic method and maximum-likelihood implementovaný v softwaru MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013; Kumar et al., 2016). Genetická rozdílnost a fylogenetické vztahy kmenů byly také hodnoceny pomocí parciálních sekvencí rpsA (kódující 30S ribozomální protein S1) a rplB (kódující 50S ribozomální protein L2) geny. Primery lemující variabilní oblasti byly navrženy na základě sekvencí genu nalezených v genomech dostupných v databázi NCBI <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>>, tak, aby byly použitelné k identifikaci, charakterizaci a k fylogenetickým studiím co největší počet různých druhů. Primery byly generovány pomocí aplikace Primer3 na základě konsenzuální sekvence vytvořené algoritmem Genetical Alignment v softwaru Geneious 7.1.7. Následně použité primery byly pomocí reakce PCR vytvořeny amplikony. Výpočty sekvenčních podobností byly automaticky provedeny v programu Geneious v7.1.7. (Kearse et al., 2012). Metodika pro tvorbu fylogenetických stromů založené na variabilních oblastech byly vytvořeny podobně jako u 16S rRNA. Pro účely srovnání byly sekvence kmenů získány hlavně z kompletních genomových sekvencí umístěných v databázi NCBI.

5.4.8. Fenotypová charakterizace

Fenotypové hodnocení fylogeneticky příbuzných bakteriálních kmenů se soustředilo na profilování buněčných mastných kyselin, stanovení rozsahu teploty růstu a pH, biochemické vlastnosti (schopnost fermentovat různé sacharidy, aktivitu specifických enzymů), stanovení specifické extracelulární aktivity enzymů, fermentačních produktů, buněčné morfologie, peptidoglykanové struktury a citlivosti na podmínky aerobního růstu. Profily buněčných mastných kyselin byly analyzovány s použitím standardu Supelco 37 Component FAME Mix (USA) (Killer et al., 2010). Buňky byly kultivovány za přísně anaerobních podmínek v modifikovaném PYG mediu. Toto růstové médium bylo také použito pro účely dalších fenotypových analýz. Teplotní rozsah a rozsah růstu pH byly testovány na

základě metody (Killer et al., 2013). Schopnost fermentovat různé zdroje organického uhlíku a produkovat různé enzymy byly zkoumány pomocí testovacích proužků API 50 CHL, API ZYM a Rapid ID 32A (všechny bioMérieux, Francie) podle pokynů výrobce.

Pro aktivity extracelulárních enzymů karboxymethylcelulasy (CMCase, endo-1,4- β -D-glukansy EC 3.2.1.4), celobiohydrolasy, glukosidasy (1,4- β -D-glukosidasy EC 3.2.1.21) a xylanasy (xylanasy, 1,4- β -D-xylanu xylanohydrolasy, EC 3.2.1.8), které jsou spojeny s celulolytickými aktivitami u mikroorganismů (Hong et al., 2001), byly kultury kultivovány v modifikovaném PYG mediu obsahujícím různé substráty (0,8% hmotn./obj.) Podle stanovení specifického enzymu. Celulosa (Whatman CC41, Sigma-Aldrich), karboxymethylcelulosa (Sigma-Aldrich), hemicelulosa ze slámy, xylan z bukového dřeva (TCI, Japonsko) a celobiosa (Sigma-Aldrich) byly použity jako jediný a definovaný zdroj organického uhlíku. Xylan a celobiosa byly použity pouze pro stanovení aktivity xylanasy a β -glukosidasy. Bakterie byly kultivovány za striktně anaerobních podmínek při teplotě 39 °C po dobu 48 hodin. Enzymatické aktivity byly měřeny v supernatantu centrifugovaných (9000 x g, 20 min) buněk. Metody pro CMCase a XYLase jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení zvýšené koncentrace redukujících skupin v hydrolyzátu polysacharidu (Lever 1977). Aktivita CBHase a β -glukosidasy byla analyzována pomocí spektrofotometrických metod, jak bylo popsáno výše (Deshpande et al., 1984; Saha a Bothast 1996). Enzymová aktivita byla vyjádřena jako množství (μ g) produktu (redukujících cukrů) uvolněného během reakční doby 1 hodinu (h) v určitém objemu vzorku (ml) na 1 mg bílkoviny. Koncentrace bílkovin byly stanoveny za použití spektrofotometrické metody (Bradford 1976). V kmenech byly detekovány i krátké řetězce mastných kyselin (SCFA). Byly měřeny po kultivaci v PYG mediu obsahující glukosu, celobiosu (Sigma-Aldrich), xylan z bukového dřeva (TCI, Japonsko), hemicelulosu ze slámy, karboxymethylcelulosu (Sigma-Aldrich) a filtrační papír celulosu (Whatman CC41, Sigma-Aldrich) jako definované zdroje organického uhlíku (vše v koncentraci 0,8% hmotn./obj.). SCFA byly analyzovány v supernatantech (centrifugovány při 12 000 g po dobu 15 min), poté byly filtrovány kultivačními filtry o velikosti 0,2 μ m. Kultivace na glukose, celobiose (2 dny při 39 °C), xylan a hemicelulosa (7 dnů) a nakonec mikrokystalická celulosa (14 dnů) metodou kapilární izotachoforézy. Koncentrace nízkomolekulárních organických kyselin (mravenčí, jantarová, mléčná a octová) byly stanoveny kapilární elektroforézou (Wasielewska et al., 2014) na elektroforetickém analyzátoru EA 101 (Villa Labeco, Slovensko) s detektorem vodivosti. Beta-alanin HCl (pH 3,5) byl použit jako přední elektrolyt a kyselina kapronová jako konečný elektrolyt.

Schopnost testovaných bakterií růst v přítomnosti kyslíku byla testována na základě kultivace na PYG a také na agaru M10.

5.4.9. Ověření biochemické aktivity vybraných kmenů při štěpení různých typů celulosy, zejména aktivity celulasy (EC 3.2.1.4), endoglukanasy (EC 3.2.1.6) a celobiohydrolasy (EC 3.2.1.91)

Ověření biochemické aktivity vybraných kmenů při štěpení různých typů celulosy a xylanu, zejména aktivity celulasy, endoglukanasy a celobiohydrolasy je uvedeno níže v části metodiky pod bodem 5.5. stanovení enzymové aktivity a substrátové specifity, zymografická analýza.

5.5. Stanovení enzymové aktivity a substrátové specifity, zymografická analýza

5.5.1. Stanovení aktivity enzymů celulasy a xylanasy (Lever, 1977)

Metoda je založena na měření přírůstu koncentrace redukujících skupin v hydrolyzátu polysacharidu. Enzymové aktivity byly měřeny v supernatantu centrifugovaných (9000 x g, 20 min) buněk či bacherového obsahu. Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného enzymového extraktu, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu. Použité substráty pro jednotlivé enzymy jsou uvedeny v tabulce 7. Suspenze byla promíchána a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 60 min. Slepé vzorky obsahující stejnou směs nebyly inkubovány a reakce byla ihned zastavena přidáním 0,4 ml ZnSO₄ a 0,4 ml Ba(OH)₂. Směs byla promíchána a stočena v centrifuze po dobu 10 min při 4000 ot.min⁻¹. Po ukončení inkubace byly vzorky ošetřeny stejným způsobem. Do nově připravených zkumavek bylo napipetováno 0,2 ml dH₂O, 0,1 ml odstředěného supernatantu a 0,9 ml čerstvě připraveného činidla PAHBAH. Roztok byl promíchán a inkubován při teplotě 100 °C po dobu 10 min. Extinkce roztoku byla měřena ve spektrometru při vlnové délce 410 nm. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Enzymová aktivita byla vyjádřena jako množství (μg) produktu (redukujících cukrů) uvolněného během reakční doby 1 hodinu (h) v určitém objemu vzorku (ml) na 1 mg bílkoviny. Koncentrace bílkovin byly stanoveny za použití spektrofotometrické metody (Bradford 1976).

Tabulka 7: Typ substrátu, roztoku a rozsahu kalibrace

Enzym	Substrát	Roztok kalibrace	Rozsah $\mu\text{g/ml}$
Celulasa	CMC (karboxymethylcelulasa)	CMC (karboxymethylcelulasa)	0 - 100
Xylanasa	sonikovaný xylan	sonikovaný xylan	0 - 100

5.5.2. Stanovení aktivity β -glukosidasy (Saha et al., 1996)

Metoda je založena na měření přírůstu uvolněného žlutého p-nitrofenolu. Enzymové aktivity byly měřeny v supernatantu centrifugovaných (9000 x g, 20 min) buněk či bacherového obsahu. Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného enzymového extraktu, 0,2 ml pufru a 0,1 ml substrátu. Jako substrát byl použit roztok PNP- β -D-glukopyranosidu. Suspenze byla promíchána a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 60 min. Slepé vzorky obsahující stejnou směs nebyly inkubovány a reakce byla ihned zastavena přidáním 0,8 ml 2% Na_2CO_3 . Po ukončení inkubace byla reakce ukončena stejným způsobem. Extinkce roztoku byla měřena při vlnové délce 410 nm pomocí spektrofotometru Thermo Spectronic 5. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Ke kalibraci byla použita ředící řada roztoku p-nitrofenolu ve vodě v koncentracích 0 - 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Enzymová aktivita byla vyjádřena jako množství (μg) produktu (redukujících cukrů) uvolněného během reakční doby 1 hodinu (h) v určitém objemu vzorku (ml) na 1 mg bílkoviny. Koncentrace bílkovin byly stanoveny za použití spektrofotometrické metody (Bradford 1976).

5.5.3. Stanovení aktivity celobiohydrolasy (Deshpande et al., 1984)

Metoda je založena na měření přírůstu uvolněného žlutého p-nitrofenolu. Enzymové aktivity byly měřeny v supernatantu centrifugovaných (9000 x g, 20 min) buněk či bacherového obsahu. Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml vhodně zředěného enzymového extraktu, 0,1 ml pufru, 0,1 ml laktonu kyseliny glukuronové a 0,1 ml substrátu. Jako substrát byl použit roztok PNP- β -D-glukopyranosidu. Suspenze byla promíchána a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 60 min. Slepé vzorky obsahující stejnou směs nebyly inkubovány a reakce byla ihned zastavena přidáním 0,8 ml 2% Na_2CO_3 . Po ukončení inkubace byla reakce ukončena stejným způsobem. Extinkce roztoku byla měřena při vlnové délce 410 nm pomocí spektrofotometru Thermo Spectronic 5. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Ke kalibraci byla použita ředící řada roztoku p-nitrofenolu ve vodě

v koncentracích 0 - 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Enzymová aktivita byla vyjádřena jako množství (μg) produktu (redukujících cukrů) uvolněného během reakční doby 1 hodinu (h) v určitém objemu vzorku (ml) na 1 mg bílkoviny. Koncentrace bílkovin byly stanoveny za použití spektrofotometrické metody (Bradford 1976).

5.5.4. Stanovení proteinů (Bradford, 1976)

Metoda je založena na změně absorpčního maxima Coomasie Brilliant Blue G-250 z vlnové délky 465 nm na vlnovou délku 595 nm. Tento indikátor existuje ve dvou barevných formách, modré a červené. V kyselém prostředí dochází k interakci mezi Coomasie Brilliant Blue G-250 a bílkovinou. Díky tomu je pomocí iontových a hydrofobních interakcí stabilizována aniontová forma Coomasie Brilliant Blue G-250.

Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 0,004 ml ředěného enzymového extraktu a 0,2 ml pracovního roztoku (1 objem roztoku A + 8 objemů destilované vody). Reakční směs byla promíchána a po 5 min (ponecháno při pokojové teplotě) byla intenzita vzniklého modrého zabarvení měřena při vlnové délce 595 nm pomocí spektrometru Sunrise Tecan. Obsah proteinu bylo stanoveno odečtením z kalibrační křivky v rozsahu 0 - 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako standard byl použit roztok BSA v destilované vodě. Kalibrace i vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních.

5.5.5. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Laemmli, 1970)

Základní roztoky:

A – 30 g akrylamidu, 0,8 g N,N-methylenbisakrylamidu, doplnit do 100 ml vodou.

B – 10 g SDS (dobré kvality!), doplnit do 100 ml vodou.

C – 9,1 g TRIS rozpustit v 50 ml vody, dotitrovat konc. HCl na pH 8,8 (asi 0,97 ml), doplnit do 100 ml vodou.

D – 3 g TRIS rozpustit v 50 ml vody, dotitrovat HCl na pH 6,8 a doplnit do 100 ml vodou.

E – 30,3 g TRIS, 144 g glycinu, 10 g SDS, doplnit do 1 l vodou.

F – 10 mg bromfenolové modři rozpustit v 1 ml roztoku D.

G – 1 g persíranu amonného, doplnit do 10 ml vodou.

H – Separální 10 % gel: 20 ml A, 30 ml C, 0,6 ml B, 8,8 ml H_2O , 20 μl TEMED, 0,6 ml G.

I – Zaostřovací gel: 1 ml A, 5, ml D, 0,1 ml B, 3,8 ml H_2O , 5 μl TEMED, 0,15 ml G.

J – Vzorkový pufr (neredukující): 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 4,4 ml H_2O , 0,1 ml F.

K – Vzorkový pufr (redukující): 2,4 ml D, 2 ml B, 1 ml glycerolu, 4 ml H_2O , 0,1 ml F a 0,5 ml merkptoetanolu..

L – Ekvilibrační roztok: 25 ml C, 24,5 ml H₂O a 0,5 ml B (SDS).

M – Elektrodotový pufr: 100 ml E a 900 ml H₂O.

N – Batrvící roztok 450 ml etanolu (nebo metanolu), 100 ml kyseliny octové, 450 ml H₂O, 0,5 g Coomassie Blue R-250. (event. 2,5 ml formaldehydu)

O – Odbarvovací roztok: 250 ml etanolu, 100 ml kyseliny octové, 650 ml H₂O. (event. 3% glycerolu, 0,5 % formaldehydu).

Roztoky A – E (bez B) skladovat při 4°C, B a F při pokojové teplotě. Ostatní vždy čerstvé.

Do sestavených desek byl nalit po vyznačenou rysku separační gel (tabulka 8), který se převrstvil isobutanolem nasyceným roztokem C. Gel se nechal zpolymerovat ve vodorovné poloze minimálně 1 hodinu. Z povrchu se poté odsál isobutanol a gel se ekvilibroval roztokem L po dobu 30 min. Po odsátí roztoku L se uvolněný prostor zalil zaostřovacím gelem a do desky se zasunul hřebínek. Poté co zaostřovací gel zpolymeroval, se desky připevnilly k chlazenému korpusu a horní anodová nádobka se naplnila čerstvým elektrodotovým pufrem M. Elektrodotovým pufrem M byl naplněn i dolní katodový prostor. Vzorky se nanasly podvrstvením do jamek po hřebínku. Před nanesením se vzorky po ředění redukujícím vzorkovým pufrem povařily po dobu 2 min. Jako standart byl použit Kaleidoscope standart (BioRad, USA) (14,5 – 200 kDa). Napětí 35 V se nastaví v úvodu a poté po dosažení konce zaostřovacího gelu je možné napětí zvýšit na 150 V. Gely po separaci byly pro vizualizaci proteinů barveny stříbrem nebo Coomassie blue, gely použité pro zymogramy byly nejprve renaturovány a inkubací vyvíjeny. Přehled použitých barviv je uveden v tabulce 9.

Tabulka 8: Roztoky pro separační gel

Roztoky	Objem	10% gel
A – Akrylamid	ml	10
B – SDS	ml	0,3
C – TRIS pH 8,8	ml	15
dH ₂ O se substrátem	ml	4,4
TEMED	μl	20
G - Persíran	ml	0,3

Tabulka 9: Typ barvení gelů

Identifikace proteinů	Substrát	Typ barvení
Celkové proteiny	Gel bez substrátu	Barvení stříbrem nebo Commassie blue
xylanasy	0,5 % CM-xylan	Kongo červeně
celulasy	0,5 % CMC	Kongo červeně

5.5.5.1 Metoda barvení gelu stříbrem (Blumm et al., 1987)

Gel byl fixován 1 hodinu v roztoku 40% etanolu, 10% kyseliny octové a 50% H₂O za mírného třepání. Následovně byl gel promyt řadou roztoků v následujícím režimu: 2 x 30% etanol (20min), 1 x destilovaná voda (20 min), 1 x 0,02% Na₂S₂O₂ (1 min), 3 x dH₂O (30 sec), 1 x vychlazený 0,1% 1 g NO₃ a 0,02% formaldehyd (20 min), 4 x dH₂O (30 sec). Do objevení jednotlivých zón byl gel vyvíjen v roztoku 3% Na₂CO₂ a 0,05M formaldehydu. Po promytí vodou byl ukončen barevný vývoj inkubací gelu v roztoku 5% kyseliny octové. Gel byl promyt vodou (10 min).

5.5.6. Zymografie (Flint et al., 1994)

Pro vizualizaci izoenzymů byla použita výše uvedená technika elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Při přípravě PAG se přidá podle sledované enzymové aktivity odpovídající substrát, který je po ukončení gelu a následné renaturaci a inkubace gelu v místech aktivních enzymových bandů štěpen a následně vizualizován. Renaturace se provádí opakovaným promýváním (3 x 15min) gelu v 1% Tritonu X-100 (1 x) a 50 mmol.l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 6) ředěným 1:1 dH₂O (2x). Po 2-4 hod. inkubaci při 40 °C v tomto pufru se gel obarví 15 min 0,1% (w/v) Kongo červení a poté odbarví 1M NaCl.

Barvení kongo červeně:

Renaturace proteinů byla provedena promýváním gelu v roztoku 1% Triton X-100 (15 min) a ve fosfátovém pufru (2 x 15 min). Gel byl inkubován 1 hod v tom samém pufru při teplotě 37°C a poté obarven 0,2% roztokem kongo červeně 20 minut. Odbarven byl gel v roztoku 1M NaCl po dobu 2 x 10 minut. Pro lepší identifikaci byl gel dobarven v roztoku 0,5% kyseliny octové (gel se obarvil modře a zvýraznily se kontrasty).

5.6. Izolace vybraného proteinu metodou gelové filtrace na Sephadexu

Gelová permeační chromatografie je založena na separaci molekul podle jejich molekulové hmotnosti, tvaru a velikosti (Sephadex G-25, komerčně dodávaný firmou Pharmacia). Mobilní fází je rozpouštědlo pufr. Separovaná směs molekul je nanášena na gel. Malé molekuly mohou prostoupit do gelových částic a pohybovat se tak v objemu rozpouštědla uvnitř a vně gelového síta. Touto metodou se dají oddělit frakce o velmi rozdílné molekulové hmotnosti. Jednotlivé najímané frakce byly analyzovány na obsah proteinů a specifickou enzymovou aktivitu.

5.7. Stanovení vlastností enzymu (pH optimum, teplotní optimum, stanovení inhibičního spektra)

Teplotní stabilita a pH optimum extracelulární celulasy, celobiohydrolasy a β -glukosidasy byla měřena při různých inkubačních teplotách po dobu 1 hodiny. Optimální pH a pH stabilita byla měřena po inkubaci v pufrch o různé hodnotě pH a aktivity enzymů byly stanoveny po 1 hodině.

Substrátová specifita vyjadřuje afinitu enzymu k různým substrátům, v našem případě schopnost extracelulární celulasy, celobiohydrolasy a β -glukosidasy podílet se na štěpení celulosy. Substrátová specifita byla stanovena po 1 hodinové inkubaci hrubého enzymového preparátu s různými substráty (CM-celulosa, krystalická celulosa, celobiosa, glukosa, CM-xylan) v koncentraci 2g.l^{-1} poté byla stanovena aktivita celulasy, celobiohydrolasy a β -glukosidasy.

Vliv iontů a chemikálií na celulasy, celobiohydrolasy a β -glukosidasy. Aktivitu enzymu mohou ovlivnit látky, které blokují aktivní místo nebo mění konformaci enzymu, která vede ke změně katalytické aktivity. Studovali jsme proto aktivační či inhibiční účinek 16 chemikálií na aktivitu celulasy, celobiohydrolasy a β -glukosidasy.

Hodnoty se vyjadřují v procentech, přičemž 100 % aktivita celulasy, která se 1 hodinu inkubuje při 40°C jen v čistém 100 mM fosfátovém pufru pH 6 bez přídavku jakéhokoliv iontu nebo chemikálie. Bylo použito iontů kovů (Ba^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} a Mn^{2+}) a vybraných ostatních látek (L-cystein, EDTA, SDS, 1,4-dithiotreitol, kyselina jodoctová, thimerosal, iodacetamid, phenylmetansulfonyl fluorid).

6. VÝSLEDKY A DISKUSE

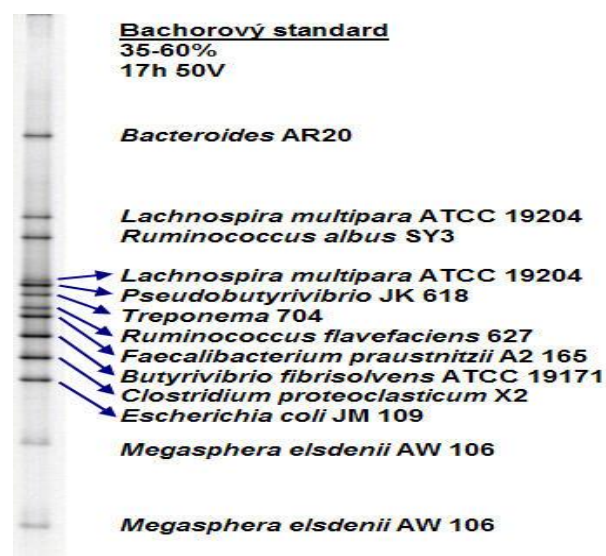
6.1. Molekulárně-genetický screening zastoupení celulolytických mikroorganismů v bachorovém obsahu jelena evropského pomocí molekulárně-genetických metod

Pomocí molekulárně genetických metod byla zkoumána mikrobiální struktura mikrobiálního osídlení v bachoru jelena evropského. Tento výzkum jsme provedli pomocí v dnešní době běžně používaných metod. Nejprve jsme analyzovali vzorky odebraných z bachorů jednotlivých zvířat metodou denaturační gradientové gelové elektroforézy, kde jsme analyzovali bakteriální populace v bachoru jelení zvěře žijící ve volné přírodě s populací žijící v oborním chovu. Dále jsme stejné vzorky analyzovali metodou qPCR Real-Time, kterou jsme kvantifikovali typické druhy bakterií zastoupených v bachoru, se zaměřením na hlavní představitele celulolytických druhů bakterií. Dále jsme touto metodou analyzovali stejnou mikroflóru vyskytující se v exkrementech zvířat. V posledním kroku jsme popsali pomocí sekvenování nové generace komplexní bakteriální populaci v bachoru jelena evropského.

6.1.1. Charakteristika bakterií v bachoru pomocí DGGE

Pro získání znalostí o charakteristice mikroorganismů v bachoru jelena evropského byly analyzované vzorky odebrané ze dvou lokalit chovu. První byl chov jelení zvěře ve volné přírodě bez radikálních zásahu člověka do diety a druhý chov byl zaměřen na intenzivní chov jelení zvěře prováděný v oboře, kde člověk celoročně ovlivňuje dietu zvěře vlivem celoročního příkrmování zvěře. Z těchto vzorků byla vyizolována DNA, která v dalších krocích byla amplifikována V3 oblast 16S rDNA, na základě použitých primerů. Amplifikovaná oblast rDNA byla pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy rozdělena na jednotlivé fragmenty, které znázorňují jednotlivé druhy bakterií. Jednotlivé fragmenty byly analyzovány softwarem pro normalizaci gelu s detekcí pásem, z čeho byla vypočítána diverzita a matice vzdáleností jednotlivých vzorků. Dále byl na základě Pearsonovy korelace vytvořeny dendrogramy. Vybrané fragmenty byly následně vyříznuty z gelu, tyto úseky byly znovu amplifikovány. Po amplifikaci byla ověřena jejich čistota a dále byly sekvenovány. Získaná konsensní sekvence byla identifikována v softwaru SEED2 a porovnána databázemi NCBI (Kearse et al., 2012). Získané DGGE profily a dendrogramy

jsou znázorněny na obrázcích 11 – 18, výsledky získaných sekvencí jsou uvedeny v tabulkách 10 – 13.



Obrázek 10: Použitý bachorový standard při DGGE metodě

6.1.1.1. Charakteristika bakterií v bachoru jelenů, vzorky č. 1 – 21

V této fázi pokusu byly stanoveny bakteriální druhy vyskytující se v bachoru jelenů odebraných z volného chovu. Bylo analyzováno 21 vzorků, konkrétně vzorky č. 1 – 21. Na obrázku 11 - je znázorněn profil DGGE celkové bakteriální populace, na obrázku 12 - je znázorněn dendrogram vyjadřující příbuznost jednotlivých bakteriálních populací mezi jednotlivými vzorky jelenů. V tabulce 10 - jsou zpracovány výsledky s určením získaných sekvencí z osekvenovaných vybraných fragmentů a porovnaných s databázemi NCBI (Kearse et al., 2012).

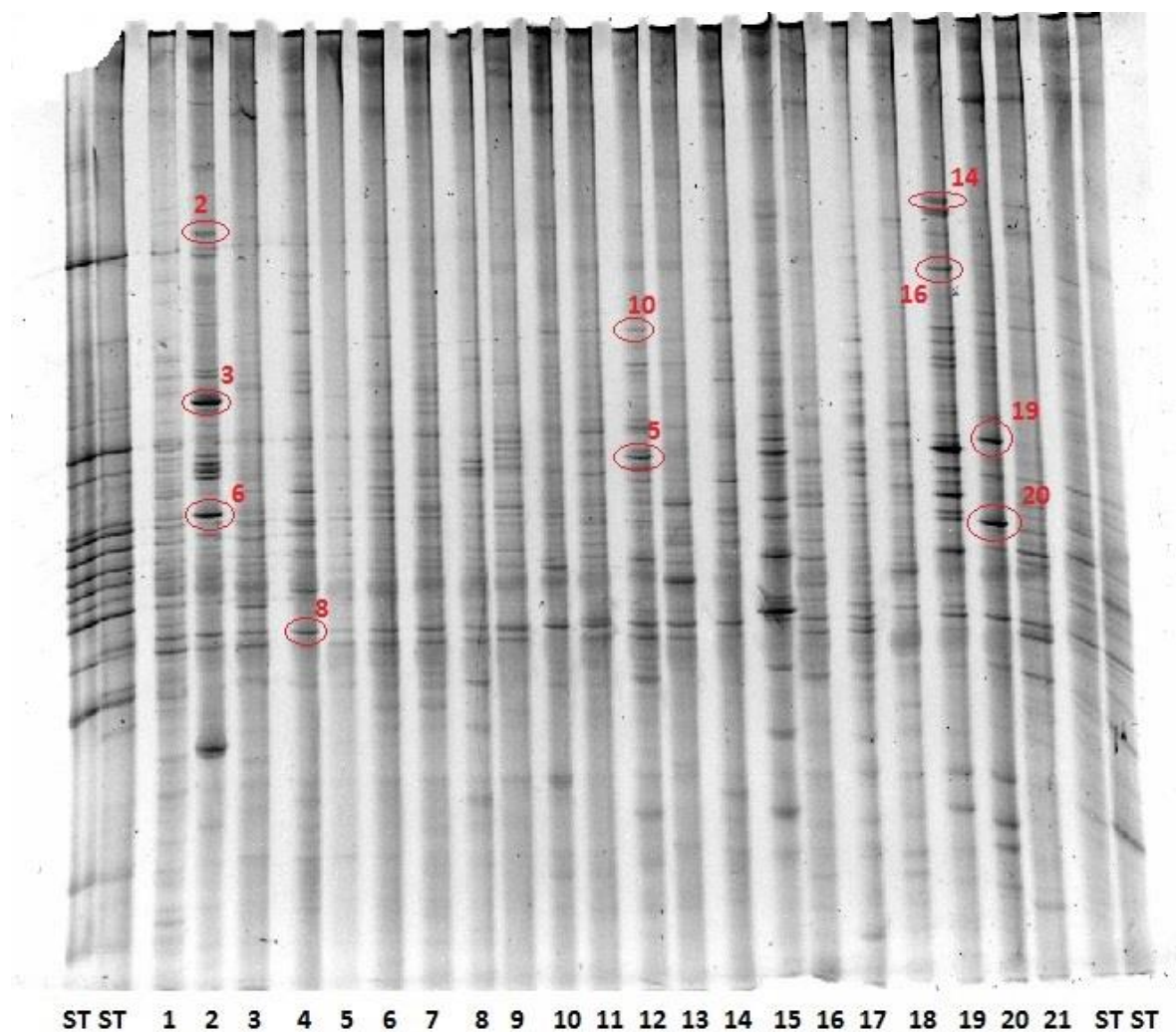
Z výsledků vyplývá, že některé druhy bakterií jsou zastoupeny u více zvířat, jedná se fragmenty 2, 5, 10 a 19. V případě fragmentů 6, 8 a 20 je jejich zastoupení u všech zvířat. Ojedinelé výskyty jsou u fragmentů 3, 14 a 16. Tyto fragmenty jsou zastoupeny pouze u jednotlivých zvířat.

Bakteriální druhy *Quinella ovalis* (fragment 6) a nekultivovaná bakterie rodu *Clostridium* sp. (fragment 8), a druh *Prevotella ruminocola* (fragment 20) se vyskytují u všech testovaných zvířat.

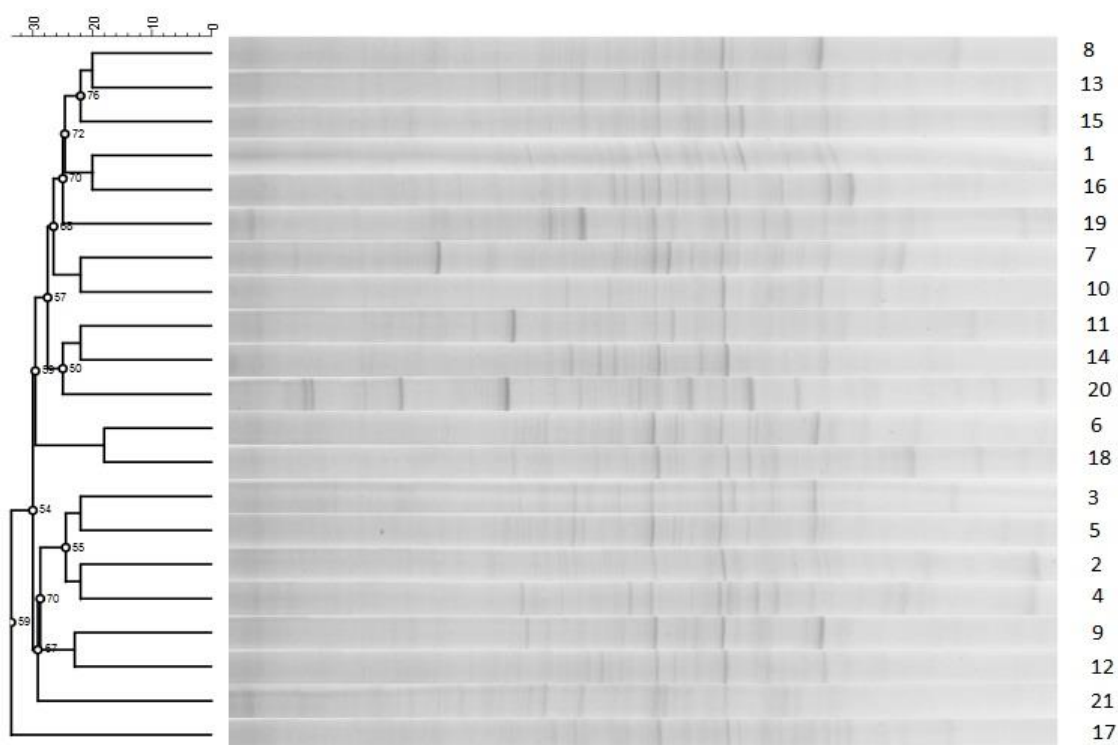
Dalšími druhy, které se vyskytují u více zvířat jsou *Clostridium aminovalericum* (fragment 2), *Pseudomonas poea* (fragment 5), nekultivovaná bakterie rodu *Thermogemmatispora* sp. (fragment 10) a nekultivovaná bakterie rodu *Prevotella* sp.

(fragment 19). *Clostridium aminovalericum* se vyskytuje u vzorků zvířat č. 2, 15, 17, 19, 20 a 21. Druh *Pseudomonas poea* se vyskytuje u vzorků zvířat č. 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 16, 17 a 19. U vzorků 15 a 19 je tato bakterie na gelu velice výrazná. Nekultivovaná bakterie rodu *Thermogemmatispora* sp., se vyskytuje u vzorků zvířat č. 6, 7, 8, 9, 10, 16. Nekultivovaná bakterie rodu *Prevotella* sp., se vyskytuje u vzorků zvířat č. 2, 5, 8, 9, 14, 15 a 18.

Ojedinělý výskyt má nekultivovaná bakterie rodu *Cytophaga* sp. (fragment 3). Tato bakterie byla zaznamenána pouze u vzorku č. 2. Dalším ojedinělým výskytem bakterií u jednoho zvířete je vzorek č. 19, kde byly identifikovány fragmenty 14 a 16, jako *Pseudomonas putida* a nekultivovaná bakterie rodu *Pseudomonas* sp.



Obrázek 11: GEL 1, profil celkové bakteriální populace v bachoru jelenů vzorků č. 1 – 21 (volný chov)



Obrázek 12: Dendrogram DGGE gelu 1, porovnání na základě vzdálenosti podobnosti jednotlivých vzorků mezi sebou na základě UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages).

Tabulka 10: Výsledky sekvenování vyřezaných bandů z gelu 1

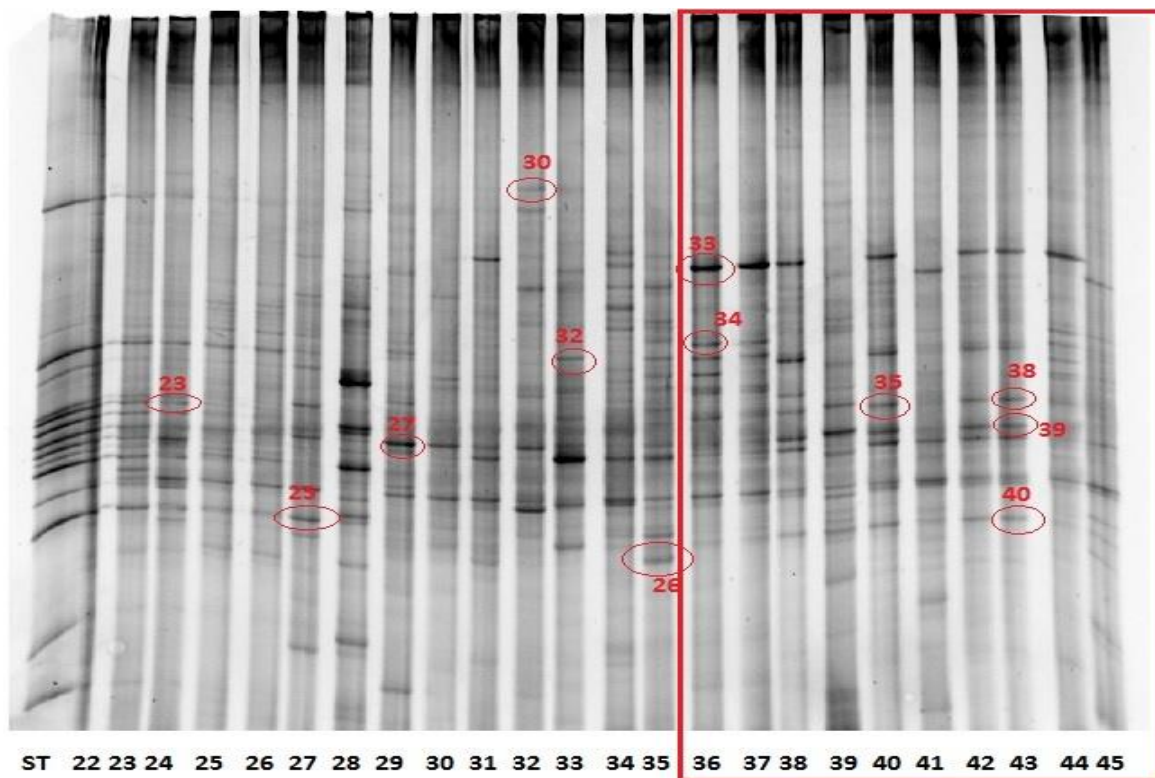
Vzorek	Druh bakterie	Coverage(%)
2	<i>Clostridium aminovalericum</i> ; BEY11 KC331198-1527 Bacteria; Firmicutes	84,10
3	<i>Cytophaga</i> sp. P1 AF260716-125883 Bacteria; Bacteroidetes	97,40
5	<i>Pseudomonas poae</i> ; ZR1-10_Ps KJ024682-200451 Bacteria; Proteobacteria	99,00
6	<i>Quinella ovalis</i> M62701-1568 Bacteria; Firmicutes	93,00
8	<i>Clostridium</i> sp. Culture-1 AB622814-1003343 Bacteria; Firmicutes	63,00
10	<i>Thermogemmatispora</i> sp. PM6 KF193528-1401546 Bacteria; Terrabacteria	56,10
14	<i>Pseudomonas putida</i> ; 24 2R23 AM086259-303 Bacteria; Proteobacteria	100,00
16	<i>Pseudomonas</i> sp. AR1(2) JX154208-1294954 Bacteria; Proteobacteria	100,00
19	<i>Prevotella</i> sp. DJF_B116 EU728713-537294 Bacteria; ; Bacteroidetes	100,00
20	<i>Prevotella ruminicola</i> ; SR-27 KM040781-839 Bacteria; Bacteroidetes	97,40

6.1.1.2. Charakteristika bakterií v bachoru jelenů, vzorky č. 22 – 45

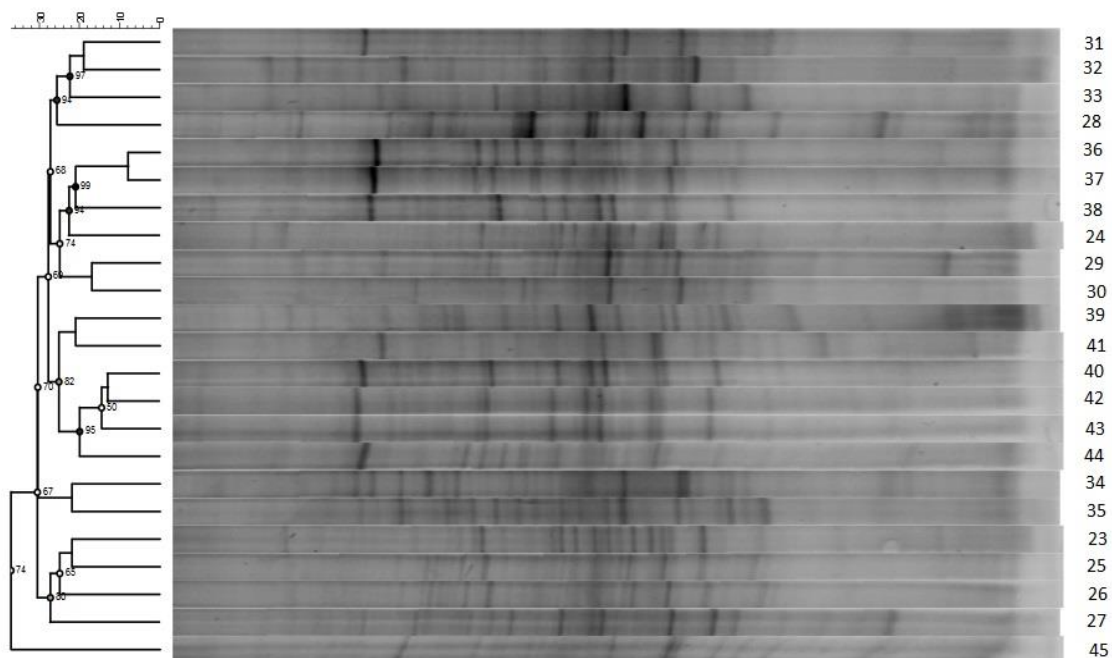
V další fázi pokusu byly stanoveny bakteriální druhy vyskytující se bachorech jelenů odebraných z volného chovu a jelenů odebraných z oborního chovu. Analýza byla provedena na 24 vzorcích. Vzorky č. 22 – 35 byly odebrány z bachoru jelenů žijících ve volné přírodě a

vzorky č. 36 – 45 byly odebrány z bachoru jelenů žijících v oboře. Obrázek 13 - znázorňuje DGGE profil bakteriální populace a obrázek 14 - vyjadřuje dendrogram příbuznosti jednotlivých bakteriálních populací mezi jednotlivými vzorky jelenů. V tabulce č. 11 jsou zpracovány výsledky s určením získaných sekvencí z osekvenovaných fragmentů, které byly porovnány s databázemi NCBI (Kearse et al., 2012). Červeně zvýrazněné druhy bakterií v tabulce č. 11 vyjadřují bakterie, které byly identifikovány u vzorků pocházející z oborního chovu zvířat.

Z výsledků je patrné, že řada bakterií se vyskytují u všech druhů zvířat. Konkrétně se jedná o fragmenty 23, 25, 27, 32, 35, 38, 39 a 40. Konkrétně se jedná o nekultivovanou bakterii rodu *Veillonella* sp. (fragment 23), bakterii *Fusobacterium naviforme* (fragment 25), bakterii *Ruminococcus flavefasiens* (fragment 27), bakterii *Prevotella ruminocola* (fragment 32), nekultivovanou bakterii rodu *Veillonella* sp. (fragment 35), bakterii *Quinella ovalis* (fragment 38), nekultivovanou bakterii *Clostridium* sp. (fragment 39) a bakterii *Fusobacterium naviforme* (fragment 40). Tyto zmíněné druhy bakterií se vyskytovali ve vzorcích odebraných u všech zvířat, tudíž jak u vzorků z volné populace, tak u vzorků z obory. U zvířat vzorků č. 24, 27, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 42 a 43 se vyskytovala bakterie *Ruminococcus flavefasiens* (fragment 30). Vyšší výskyt této bakterie byl pozorován u vzorků odebraných v populaci zvířat z obory. Zajímavým zjištěním byl výskyt bakterie *Ruminococcus bromii* (fragment 33) a nekultivované bakterie *Prevotella* sp. (fragment 34). Bakterie *Ruminococcus bromii* se vyskytoval pouze u vzorků odebraných z oborního chovu zvířat a byl identifikován u vzorků zvířat č. 36, 37, 38, 40, 42, 43 a 44. Nekultivovaná bakterie rodu *Prevotella* sp., byla identifikována také pouze u oborního chovu a pouze u vzorků zvířat č. 36, 37, 44 a 45.



Obrázek 13: GEL 2, profil celkové bakteriální populace v bachoru jelenů vzorků č. 22 – 35 (volný chov) a vzorků č. 36 – 45 (oborní chov) - vzorky č. 36 – 45 v červeném obdélníku jsou vzorky jelenů z oborního chovu



Obrázek č. 14: Dendrogram DGGE gelu 2, porovnání na základě vzdálenosti podobnosti jednotlivých vzorků mezi sebou na základě UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages)

Tabulka 11: Výsledky sekvenování vyřezaných bandů z gelu 2

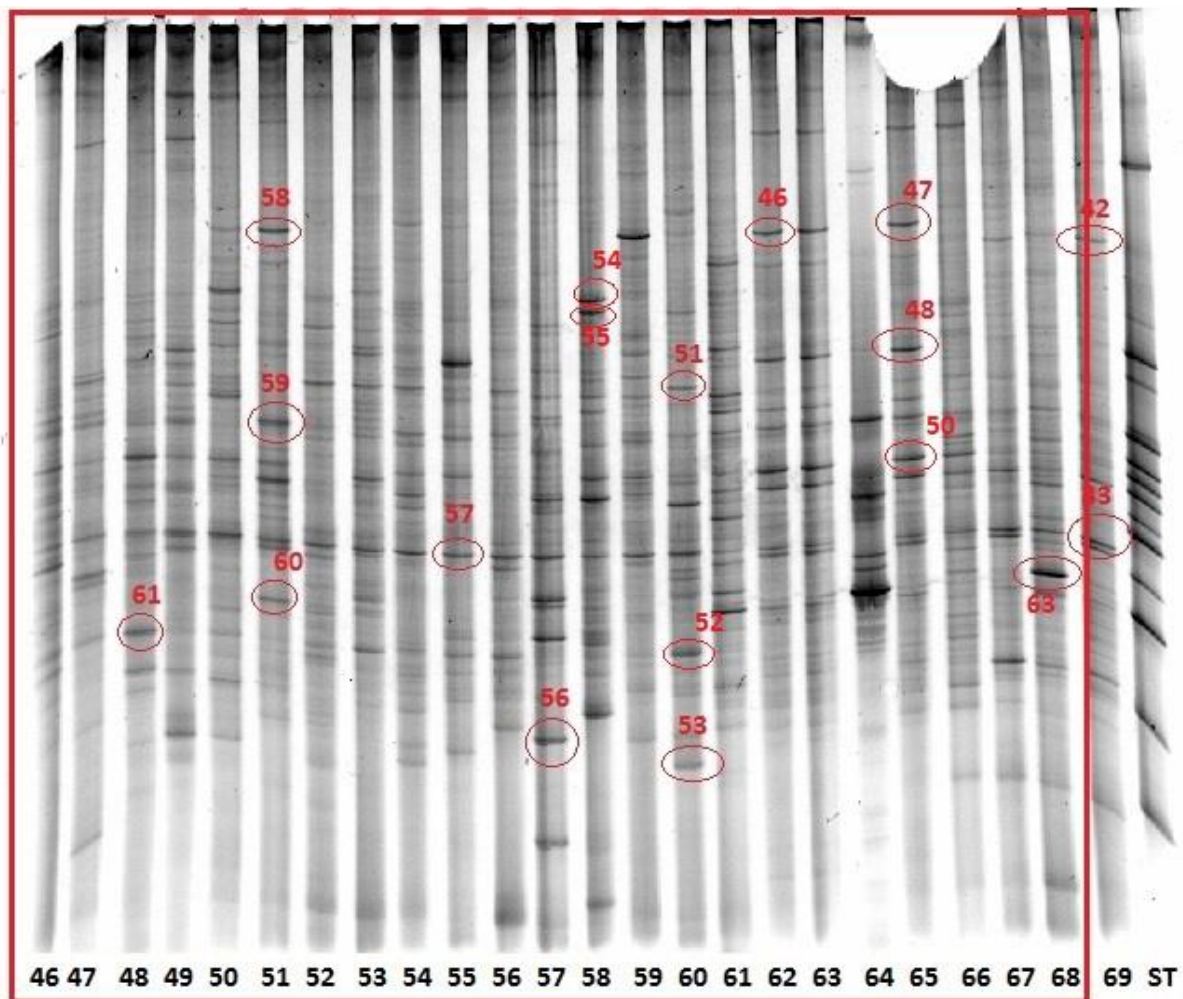
Vzorek	Druh bakterie	Coverage(%)
23	<i>Veillonella</i> sp. ICM51a HQ616397-936591 <i>Bacteria; Firmicutes</i> ;	73,30
25	<i>Fusobacterium naviforme</i> HQ223106-77917 <i>Bacteria; Fusobacteria</i>	82,00
26	<i>Clostridiales</i> genomosp. BVAB3 str. UPII9-5 CP001850-699246 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	83,40
27	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ; RGL 25 GU999991-1265 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	82,20
30	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ; CA22 AB849343-1265 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	79,50
32	<i>Prevotella ruminicola</i> ; SR-27 KM040781-839 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	97,40
33	<i>Ruminococcus bromii</i> ; YE282 DQ882649-40518 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	80,10
34	<i>Prevotella</i> sp. GU432133-712493 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	98,50
35	<i>Veillonella</i> sp. ICM51a HQ616397-936591 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	73,30
38	<i>Quinella ovalis</i> M62701-1568 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	93,00
39	<i>Clostridium</i> sp. Culture-1 AB622814-1003343 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	63,00
40	<i>Fusobacterium naviforme</i> HQ223106-77917 <i>Bacteria; Fusobacteria</i>	82,00

6.1.1.3. Charakteristika bakterií v bachoru jelenů, vzorky č. 46 – 69

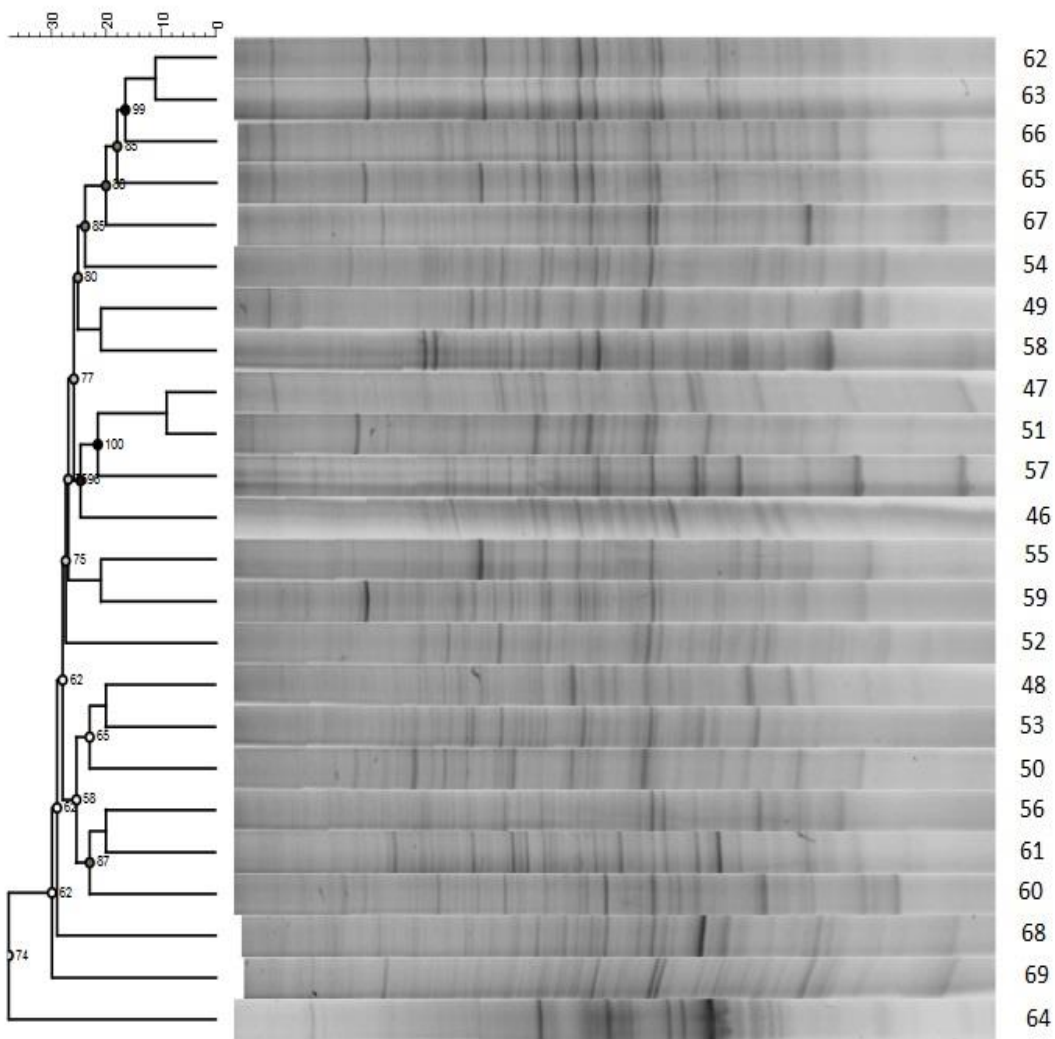
V předposlední fázi pokusu byly identifikovány bakteriální druhy vyskytující se bachorech jelenů odebraných z oborního chovu a jednoho vzorku z bachoru daňka odebraného též z oborního chovu. Analýza byla provedena na 24 vzorcích. Vzorky č. 46 – 68 byly odebrány z bachoru jelenů a vzorek č. 69 byl odebrán z bachoru daňka. Obrázek 15 - znázorňuje DGGE profil bakteriální populace a obrázek 16 vyjadřuje dendrogram příbuznosti jednotlivých bakteriálních populací mezi jednotlivými vzorky zvířat. Zpracované výsledky osekvenovaných fragmentů a určení bakterií vyjadřuje tabulka 12. Červeně zvýrazněné druhy bakterií v tabulce 12 vyjadřují bakterie, které byly identifikovány u vzorků pocházející pouze z oborního chovu jelenů.

Z výsledků vyplývá, že ve všech vzorcích zvířat bez ohledu na druh se vyskytují nekultivované bakterie rodu *Prevotella* sp. (fragment 42), bakterie *Saccharofermentans acetigenes* (fragment 43), nekultivovaná bakterie *Prevotella* sp. (fragment 48), bakterie *Quinella ovalis* (fragment 50), nekultivovaná bakterie rodu *Saccharofermentans* sp. (fragment 51), nekultivovaná bakterie třídy *Clostridiales* (fragment 52), bakterie *Prevotella ruminicola* (fragment 56), nekultivovaná bakterie rodu *Clostridium* sp. (fragment 57), bakterie *Clostridium aminovalericum* (fragment 59) a bakterie *Hallella seregens* (fragment 61). Mezi bakterie, které se vyskytují u více zvířat, patří *Ruminococcus flavefaciens* (fragment 46 a 47), která se vyskytuje u vzorků zvířat č. 50, 51, 53, 54, 56, 62, 63, 64, 65, 66 a 67. Další zástupcem vyskytující se u více druhů zvířat je bakterie *Ruminococcus bromii* (fragment 54 a 58), které se vyskytuje u vzorků č. 50, 51, 54, 59, 60, 66, 67 a 68. Další bakterií je nekultivovaná bakterie rodu *Pseudomonas* sp. (fragment 55) vyskytující se u vzorků č. 48, 50,

53, 54, 60, 61, 66, 67 a 68. Byly identifikovány bakterie, které měly spíše sporadický výskyt pouze u jednotlivých vzorků zvířat. Konkrétně se jednalo o nekultivovanou bakterii rodu *Prevotella* sp. (fragment 53), vyskytující se pouze u vzorku č. 60, dále bakterie *Lactonifactor longoviformis* (fragment 60), vyskytující se u vzorku č. 51 a 53, a posledním druhem byla nekultivovaná bakterie rodu *Isoptericola* sp. (fragment 63), která byla identifikována ve vzorku č. 68.



Obrázek 15: GEL 3, profil celkové bakteriální populace v bachoru jelenů vzorků č. 46 – 68 (oborní chov) a vzorku č. 69 daňka (oborní chov) - vzorky č. 46 – 68 v červeném obdelníku jsou vzorky jelenů z oborního chovu



Obrázek 16: Dendrogram DGGE gelu 3, porovnání na základě vzdálenosti podobnosti jednotlivých vzorků mezi sebou na základě UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages)

Tabulka 12: Výsledky sekvenování vyřezaných bandů z gelu 3

Vzorek	Druh bakterie	Coverage(%)
42	<i>Prevotella</i> sp. DJF_CP65 EU728727-537295 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	56,90
43	<i>Saccharofermentans acetigenes</i> ; JCM 14006 AB910750-319644 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	40,30
46	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ; CA22 AB849343-1265 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	98,50
47	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ; CA22 AB849343-1265 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	79,50
48	<i>Prevotella</i> sp. oral taxon G60; WWP_SS5_G16 GU432133-712493 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	98,50
50	<i>Quinella ovalis</i> M62701-1568 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	93,00
51	<i>Saccharofermentans</i> sp. G8 AB730782-1200659 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	80,70
52	<i>Clostridiales</i> genomsp. BVAB3 str. UPII9-5 CP001850-699246 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	83,40
53	<i>Prevotella</i> sp. HGA0225 JX519830-1319137 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	98,90
54	<i>Ruminococcus bromii</i> ; YE282 DQ882649-40518 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	81,10
55	<i>Pseudomonas</i> sp. AR1(2) JX154208-1294954 <i>Bacteria; Proteobacteria</i>	100,00
56	<i>Prevotella ruminicola</i> ; TC2-28 AF218619-839 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	97,90
57	<i>Clostridium</i> sp. Culture-1 AB622814-1003343 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	63,00
58	<i>Ruminococcus bromii</i> ; YE282 DQ882649-40518 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	73,60
59	<i>Clostridium aminovalericum</i> ; BEY11 KC331198-1527 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	84,10
60	<i>Lactonifactor longoviformis</i> (T); ED-Mt61/PYG-s6 DQ100449-341220 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	81,50
61	<i>Hallella seregens</i> (T); ATCC 51272 X81877-52229 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	70,90
63	<i>Isoptericola</i> sp. R-1-R-1 KM362870-1571672 <i>Bacteria; Actinobacteria</i>	97,90

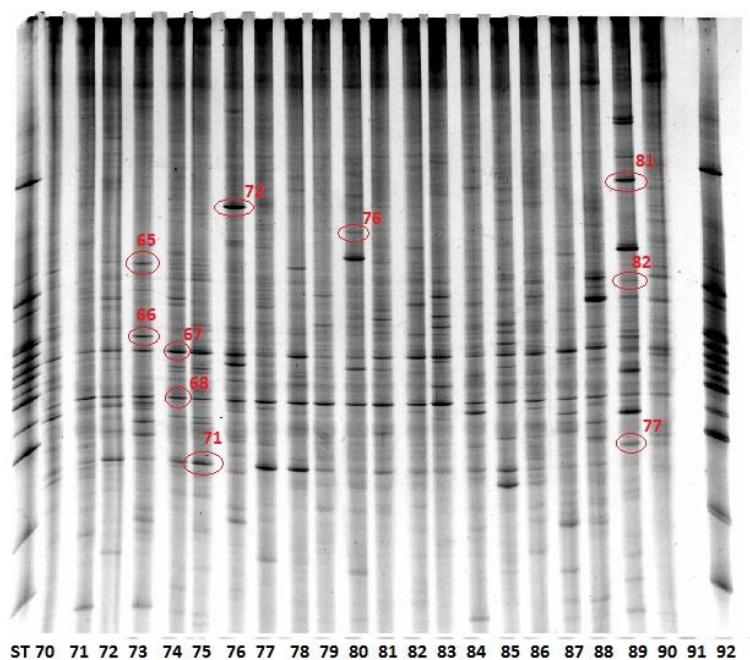
6.1.1.4. Charakteristika bakterií v bachoru jelenů, vzorky č. 70 – 92

V poslední fázi pokusu založené na analýze bachorových obsahů pomocí metody DGGE byly stanoveny bakteriální druhy vyskytující se v bachorech daňků odebraných z oborního chovu, jednoho kusu srnce a jednoho kusu tura domácího. Analýza byla provedena na 23 vzorcích. Vzorky č. 70 – 90 byly odebrány z bachoru daňků žijících v oborním chovu, vzorek č. 91 byl odebrán z bachoru srnce obecného žijícího ve volnosti a vzorek č. 92 byl odebrán z bachoru tura domácího žijícím ve farmovém chovu. Obrázek 17 - znázorňuje DGGE profil bakteriální populace a obrázek 18 - vyjadřuje dendrogram příbuznosti jednotlivých bakteriálních populací mezi jednotlivými vzorky zvířat. V tabulce 13 jsou zpracovány výsledky s určením získaných sekvencí z osekvenovaných fragmentů, které byly porovnány s databázemi NCBI.

Výsledky vyjadřují, že u všech vzorků zvířat se vyskytují nekultivované bakterie rodu *Saccharofermentans* sp. (fragment 65), bakterie *Quinella ovalis* (fragment 66), bakterie *Ruminococcus flavefaciens* (fragment 67), nekultivovaná bakterie rodu *Veillonella* sp.

(fragment 68), nekultivovaná bakterie třídy *Clostridiales* (fragment 71), bakterie *Quinella ovalis* (fragment 76 a 81) a bakterie *Prevotella ruminicola* (fragment 82).

Mezi druhy bakterií, které se vyskytují u více vzorků zvířat patří bakterie *Ruminococcus bromii* (fragment 72), vyskytující se ve vzorcích č. 76, 77, 78, 80, 82, 85, 88 a 90. Dalším druhem je bakterie *Lactonifactor longoviformis* (fragment 77), který se vyskytuje u vzorků č. 73, 77, 80, 81, 84, 89 a 90.



Obrázek 17: GEL 4, profil celkové bakteriální populace v bacheru daňků vzorků č. 70 – 90 (oborní chov)



Obrázek 18: Dendrogram DGGE gelu 4, porovnání na základě vzdálenosti podobnosti jednotlivých vzorků mezi sebou na základě UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages)

Tabulka 13: Výsledky sekvenování vyřezaných bandů z gelu 4

Vzorek	Druh bakterie	Coverage(%)
65	<i>Saccharofermentans</i> sp. G8 AB730782-1200659 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	80,70
66	<i>Quinella ovalis</i> M62701-1568 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	93,00
67	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ; RGL 25 GU999991-1265 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	82,20
68	<i>Veillonella</i> sp. ICM51a HQ616397-936591 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	73,30
71	<i>Clostridiales</i> genomsp. BVAB3 str. UPII9-5 CP001850-699246 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	83,40
72	<i>Ruminococcus bromii</i> ; YE282 DQ882649-40518 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	81,10
76	<i>Quinella ovalis</i> M62701-1568 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	99,00
77	<i>Lactonifactor longoviformis</i> (T); ED-Mt61 PYG-s6 DQ100449-341220 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	81,50
81	<i>Quinella ovalis</i> M62701-1568 <i>Bacteria; Firmicutes</i>	98,40
82	<i>Prevotella ruminicola</i> ; SR-27 KM040781-839 <i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	97,40

6.1.1.5. Indexy diverzity vzorků v analýze DGGE

Druhová bohatost jednotlivých vzorků neboli alfa diverzita byla počítána po vzorky zvířat č. 1 - 92, které byly analyzovány denaturační gradientovou gelovou elektroforézou. Jednalo se o vzorky č. 1- 35, které byly odebrány z bacherů jelenů žijících ve volném chovu, vzorky č. 36 – 38, které byly odebrány z bacherů jelenů žijících v oborním chovu, dále vzorků č. 69 -91, které byly odebrány z bacherů daňků žijících v oborním chovu a vzorku č. 91 odebraného z bacheru srnce a vzorků č. 92 odebraného z bacheru tura domácího. Abychom určili míru alfa diverzity a určili druhovou bohatost vzorků, vyrovnanost relativního zastoupení jednotlivých druhů vzorku, spočítali jsme 4 základní indexy alfa diverzity (Shannonův index, Simpsonův index, species richness a species evenness). Shannonův index vyjadřuje nejistotu, se kterou jsme schopni předpovědět, jakého druhu bude náhodně vybraný jedinec ze vzorku. Nejistota klesá s klesajícím počtem druhů a s klesající vyrovnaností. Hodnoty nabývají hodnot 1,5 – 3,5. Simpsonův index vyjadřuje pravděpodobnost, že dva náhodně vybraní jedinci budou patřit ke stejnému druhu. Se zvyšující se diverzitou hodnota indexu klesá. Index species richness vyjadřuje počet druhů ve vzorku a index evenness vyjadřuje relativní zastoupení jednotlivých druhů ve vzorku (nejvyšší hodnot dosahuje při rovnoměrném relativním zastoupení všech druhů). Dále jednotlivé indexy alfa diverzity byly testovány na rozdílnost jednotlivých indexů mezi jednotlivými skupinami zvířat pomocí Mann Whitneyova testu na hladině významnosti, $P < 0,05$. Jako kritéria byla stanovena rozdílnost populace jelenů z volného chovu, jelenů z obory a daňků z obory. Rozdílnost mezi populacemi nebyla statisticky prokázána na stanovené hladině významnosti.

Z výsledků vyplývá (tabulka 14), že hodnoty Shannonova indexu nabývají hodnot 2,61 - 3,77 u populace jelenů z volného chovu, 2,68 – 3,77 u populace jelenů z oborního chovu a 3,25 – 3,96 u daňků z oborního chovu. Hodnoty Simpsonova indexu nabývají hodnot 0,02 – 0,11 u populace jelenů z volného chovu, 0,03 – 0,10 u populace jelenů z oborního chovu a 0,02 – 0,05 u populace daňků z oborního chovu. Evenness species dosahuje hodnot u jelenů z oborního chovu 0,69 – 0,85, u jelenů z oborního chovu 0,66 – 0,83 a u daňků z oborního chovu 0,74 – 0,83. Posledním indexem, který byl v této analýze použit byl index species richness, který u jelenů z volného chovu nabývá hodnot 32,80 – 93,19, u jelenů z oborního chovu dosahuje hodnot 29,10 – 88,00, a daňků z oborního chovu nabývá hodnot 50,50 – 101,00. Po otestování všech indexů pomocí Mann Whitneyho testu na hladině významnosti $P < 0,001$, nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými testovanými skupinami zvířat. Hodnoty jednotlivých indexů vypovídají o tom, že populace bakterií u jednotlivých vzorků má rovnoměrné relativní zastoupení bakteriálních druhů.

Tabulka 14: Indexy diverzity (Shannon, Simpson, Evennes a Richness) stanovené u vzorků č. 1 – 92, žlutě označené vzorky jsou vzorky odebrané u jelenů žijících v oborním chovu

Vzorek	Zvíře	Shannon Index	Simpson Index	Species Evenness	Species Richness
1	jelen	3,64	0,03	0,76	91,02
2	jelen	3,75	0,03	0,79	93,19
3	jelen	3,61	0,03	0,77	81,69
4	jelen	3,38	0,04	0,77	84,20
5	jelen	3,43	0,04	0,74	71,50
6	jelen	3,31	0,04	0,79	58,30
7	jelen	3,34	0,05	0,76	61,00
8	jelen	3,48	0,04	0,74	75,30
9	jelen	3,44	0,04	0,68	76,20
10	jelen	3,64	0,03	0,78	84,60
11	jelen	3,13	0,06	0,73	54,60
12	jelen	3,64	0,03	0,75	86,70
13	jelen	3,49	0,04	0,75	75,70
14	jelen	3,18	0,05	0,69	59,70
15	jelen	3,68	0,03	0,78	87,20
16	jelen	3,50	0,04	0,75	73,40
17	jelen	3,77	0,02	0,85	87,00
18	jelen	3,51	0,04	0,78	74,00
19	jelen	3,30	0,04	0,75	59,60
20	jelen	3,24	0,05	0,73	55,60
21	jelen	3,52	0,03	0,78	74,50
23	jelen	3,42	0,04	0,78	61,90
24	jelen	3,12	0,05	0,71	51,50
25	jelen	3,51	0,04	0,74	75,30
26	jelen	3,37	0,04	0,76	63,20
27	jelen	3,45	0,04	0,72	70,30
28	jelen	3,08	0,06	0,73	44,90
29	jelen	3,10	0,06	0,74	48,10
30	jelen	2,97	0,07	0,72	46,60
31	jelen	2,96	0,07	0,69	47,60
32	jelen	3,06	0,06	0,73	47,10
33	jelen	2,61	0,11	0,68	32,80
34	jelen	3,33	0,04	0,73	61,90
35	jelen	3,53	0,03	0,74	73,60
36	jelen	2,76	0,09	0,72	34,44
37	jelen	2,72	0,10	0,69	34,88
38	jelen	2,91	0,07	0,66	44,60
39	jelen	3,12	0,05	0,81	44,44
40	jelen	3,09	0,06	0,63	55,30

41	jelen	3,05	0,06	0,73	48,70
42	jelen	3,12	0,05	0,71	51,50
43	jelen	3,10	0,06	0,72	50,60
44	jelen	2,82	0,07	0,76	36,40
45	jelen	3,70	0,03	0,78	88,00
46	jelen	3,59	0,03	0,77	73,60
47	jelen	3,45	0,04	0,75	66,70
48	jelen	3,53	0,03	0,80	64,80
49	jelen	3,61	0,03	0,80	68,20
50	jelen	3,58	0,03	0,78	69,50
51	jelen	3,40	0,04	0,73	61,60
52	jelen	3,74	0,03	0,81	78,40
53	jelen	3,67	0,03	0,83	70,00
54	jelen	3,59	0,03	0,79	69,80
55	jelen	3,22	0,05	0,76	51,20
56	jelen	3,76	0,03	0,81	79,40
57	jelen	3,40	0,04	0,83	51,20
58	jelen	3,36	0,04	0,78	53,30
59	jelen	3,51	0,04	0,80	61,10
60	jelen	3,53	0,04	0,76	66,20
61	jelen	3,64	0,03	0,81	67,70
62	jelen	3,52	0,04	0,73	66,50
63	jelen	3,59	0,03	0,74	72,60
64	jelen	2,68	0,08	0,73	29,10
65	jelen	3,46	0,04	0,72	64,00
66	jelen	3,77	0,03	0,79	80,10
67	jelen	3,63	0,03	0,80	68,40
68	jelen	3,36	0,04	0,80	52,10
69	daněk	3,51	0,03	0,80	64,90
70	daněk	3,86	0,02	0,82	86,90
71	daněk	3,25	0,05	0,76	50,50
72	daněk	3,59	0,03	0,77	74,60
73	daněk	3,96	0,02	0,79	99,00
74	daněk	3,29	0,04	0,79	62,80
75	daněk	3,78	0,03	0,79	87,50
76	daněk	3,79	0,02	0,82	86,00
77	daněk	3,73	0,03	0,83	79,40
78	daněk	3,69	0,03	0,76	84,70
79	daněk	3,64	0,03	0,79	76,00
80	daněk	3,83	0,02	0,82	87,90
81	daněk	3,57	0,03	0,79	68,20
82	daněk	3,41	0,04	0,76	64,30
83	daněk	3,38	0,04	0,78	56,70
83	daněk	3,94	0,02	0,79	101,00
85	daněk	3,82	0,02	0,79	90,40

86	daněk	3,87	0,02	0,81	88,70
87	daněk	3,79	0,02	0,83	83,70
88	daněk	3,43	0,04	0,79	57,40
89	daněk	3,31	0,05	0,74	58,80
90	daněk	3,72	0,03	0,74	88,40
91	srna	3,54	0,03	0,76	75,00
92	kráva	3,48	0,03	0,75	71,30

6.1.2 .Kvantifikace bakterií v bachoru pomocí qPCR

Použitím metody kvantifikační polymerázové řetězové reakce Real-Time jsme provedli kvantifikaci mikroorganismů kolonizující trávicí trakt jelena evropského. Pro tuto analýzu byly zvoleny primery, které amplifikují V3 oblast 16 S rDNA. Pomocí této metody byly využitím detekce úseků rDNA charakteristických pro typové mikroorganismy klasifikovány skupiny celkových bakterií, kmene *Bacteroides*, kmene *Firmicutes*, druh *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*. Počty jednotlivých skupin bakterií byly kvantifikovány ve dvou lokalitách a ze druhů vzorků. Byly porovnávány počty bakterií ze vzorků odebraných z bachoru jelenů z volného chovu a jelenů z chovu oborního (tabulka 15). Stejným způsobem byly stanoveny počty a porovnání bakterií v exkrementech (tabulka 16). Rozdílnost mezi jednotlivými populacemi mezi chovem ve volnosti a v oboře byla provedena na základě Mann Whitneyova testu na hladině významnosti $P < 0,05$, který prokázal signifikantní rozdíly ve vzorcích odebraných z bachoru u jelenů žijících ve volnosti u kmenů *Bacteroidetes* a *Firmicutes* a druhu *Ruminococcus albus*. Kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* mají signifikantně vyšší zastoupení u jelenů ve volném chovu než u jelenů žijící v oboře. To samé platí u celulólytického bakteriálního druhu *Ruminococcus albus*. Žádné další signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami bakterií nebyly prokázány.

Tabulka 15: Kvantifikace (qPCR) hlavních bakteriálních kmenů a tři klíčových celulólytických bakterií v bachoru jelena evropského chovaného ve volnosti a v oboře

Vzorek	Celkové bakterie	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>F. succinogenes</i>	<i>R. flavefaciens</i>	<i>R. albus</i>	
BACHOR							
1	$1,27 \times 10^{10}$	$1,01 \times 10^9$	$3,99 \times 10^9$	$1,04 \times 10^5$	$3,70 \times 10^7$	$6,51 \times 10^7$	volnost
2	$2,01 \times 10^{10}$	$1,98 \times 10^9$	$3,93 \times 10^7$	$1,42 \times 10^4$	$1,22 \times 10^6$	$1,03 \times 10^7$	
4	$1,33 \times 10^{10}$	$1,66 \times 10^9$	$1,84 \times 10^9$	$3,04 \times 10^4$	$5,47 \times 10^7$	$2,20 \times 10^7$	
5	$2,43 \times 10^{10}$	$1,87 \times 10^9$	$2,76 \times 10^9$	$2,38 \times 10^4$	$4,54 \times 10^6$	$1,73 \times 10^6$	
10	$2,03 \times 10^{10}$	$2,47 \times 10^8$	$3,54 \times 10^8$	$3,65 \times 10^3$	$2,68 \times 10^7$	$2,69 \times 10^6$	
11	$2,54 \times 10^{10}$	$1,89 \times 10^9$	$2,21 \times 10^9$	$1,85 \times 10^3$	$3,69 \times 10^6$	$7,92 \times 10^5$	
12	$2,65 \times 10^{10}$	$1,98 \times 10^9$	$2,65 \times 10^9$	$2,45 \times 10^4$	$1,63 \times 10^5$	$1,68 \times 10^6$	

13	2,62 x 10 ⁹	2,01 x 10 ⁹	2,18 x 10 ⁸	1,48 x 10 ³	3,67 x 10 ⁵	9,02 x 10 ⁵	
14	2,46 x 10 ¹⁰	2,45 x 10 ⁶	2,23 x 10 ⁸	2,64 x 10 ²	7,80 x 10 ⁴	1,88 x 10 ⁵	
21	1,34 x 10 ¹⁰	4,31 x 10 ⁸	7,12 x 10 ⁸	3,13 x 10 ³	2,94 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁶	
37	1,89 x 10 ¹⁰	3,65 x 10 ⁸	1,71 x 10 ⁹	4,39 x 10 ⁴	2,48 x 10 ⁷	3,12 x 10 ⁷	obora
38	1,23 x 10 ⁹	1,98 x 10 ⁹	2,43 x 10 ⁹	2,53 x 10 ⁴	1,12 x 10 ⁸	1,36 x 10 ⁷	
43	1,87 x 10 ⁹	2,21 x 10 ⁸	2,43 x 10 ⁸	1,39 x 10 ⁴	5,63 x 10 ⁷	5,67 x 10 ⁷	
44	2,43 x 10 ⁹	2,83 x 10 ⁸	3,43 x 10 ⁸	6,84 x 10 ³	3,58 x 10 ⁷	4,54 x 10 ⁷	
47	1,98 x 10 ¹⁰	1,54 x 10 ⁸	2,32 x 10 ⁹	1,95 x 10 ⁴	8,42 x 10 ⁸	6,54 x 10 ⁷	
48	1,36 x 10 ¹⁰	8,29 x 10 ⁸	3,20 x 10 ⁹	8,17 x 10 ³	1,22 x 10 ⁷	5,59 x 10 ⁶	
50	1,63 x 10 ¹⁰	1,37 x 10 ⁹	9,54 x 10 ⁹	3,92 x 10 ⁴	9,37 x 10 ⁷	2,71 x 10 ⁷	
57	4,05 x 10 ¹⁰	8,99 x 10 ⁷	7,49 x 10 ⁹	1,61 x 10 ⁴	1,25 x 10 ⁸	1,09 x 10 ⁷	
60	1,94 x 10 ¹⁰	5,17 x 10 ⁸	4,08 x 10 ⁹	2,07 x 10 ⁴	6,78 x 10 ⁶	1,42 x 10 ⁷	
61	2,75 x 10 ⁹	7,17 x 10 ⁸	4,03 x 10 ⁹	1,90 x 10 ⁴	1,01 x 10 ⁸	1,31 x 10 ⁷	

Tabulka 16: Kvantifikace (qPCR) hlavních bakteriálních kmenů a tří klíčových celulólytických bakterií v exkrementech jelena evropského chovaného ve volnosti a v oboře

Vzorek	Celkové bakterie	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>F. succinogenes</i>	<i>R. flavefaciens</i>	<i>R. albus</i>	
EXKREMENTY							
105	1,84 x 10 ¹⁰	6,41 x 10 ⁶	1,32 x 10 ⁸	5,32 x 10 ²	1,07 x 10 ¹	3,67 x 10 ⁵	volnost
106	2,42 x 10 ¹⁰	1,38 x 10 ⁸	1,46 x 10 ⁹	2,31 x 10 ³	4,42 x 10 ¹	1,62 x 10 ⁶	
108	1,73 x 10 ¹⁰	1,69 x 10 ⁹	1,54 x 10 ⁹	6,32 x 10 ³	2,53 x 10 ²	3,31 x 10 ⁵	
109	1,85 x 10 ¹⁰	1,32 x 10 ⁸	1,32 x 10 ⁹	7,87 x 10 ²	1,79 x 10 ³	5,72 x 10 ⁵	
110	1,54 x 10 ¹⁰	3,67 x 10 ⁸	2,49 x 10 ⁹	4,36 x 10 ³	2,52 x 10 ³	1,79 x 10 ⁶	
111	1,65 x 10 ¹⁰	1,79 x 10 ⁸	2,78 x 10 ⁹	9,62 x 10 ²	9,74 x 10 ¹	4,49 x 10 ⁶	
112	1,41 x 10 ¹⁰	2,12 x 10 ⁸	2,87 x 10 ⁹	5,26 x 10 ³	9,46 x 10 ³	3,73 x 10 ⁶	
113	2,30 x 10 ¹⁰	2,40 x 10 ⁸	5,67 x 10 ⁹	2,50 x 10 ³	8,18 x 10 ²	1,66 x 10 ⁶	
114	1,43 x 10 ¹⁰	7,37 x 10 ⁸	1,78 x 10 ⁹	5,52 x 10 ³	4,30 x 10 ³	3,97 x 10 ⁶	
115	1,80 x 10 ¹⁰	9,89 x 10 ⁶	5,45 x 10 ⁹	8,11 x 10 ³	7,19 x 10 ³	5,48 x 10 ⁶	
116	2,86 x 10 ⁹	7,47 x 10 ⁶	2,01 x 10 ⁹	1,68 x 10 ²	4,00 x 10 ²	1,12 x 10 ⁵	obora
117	2,65 x 10 ¹⁰	2,83 x 10 ⁸	1,78 x 10 ⁹	1,59 x 10 ²	1,96 x 10 ³	6,57 x 10 ⁵	
118	1,98 x 10 ¹⁰	2,67 x 10 ⁸	1,39 x 10 ⁸	4,43 x 10 ²	4,39 x 10 ³	2,92 x 10 ⁶	
120	1,54 x 10 ¹⁰	2,41 x 10 ⁸	2,73 x 10 ⁸	6,41 x 10 ²	5,48 x 10 ²	3,49 x 10 ⁶	
121	2,36 x 10 ¹⁰	4,52 x 10 ⁸	1,55 x 10 ⁹	1,68 x 10 ⁴	1,31 x 10 ⁴	2,79 x 10 ⁶	
122	1,84 x 10 ¹⁰	2,27 x 10 ⁷	1,78 x 10 ⁹	5,65 x 10 ²	1,76 x 10 ³	3,90 x 10 ⁵	
124	1,87 x 10 ¹⁰	5,70 x 10 ⁸	1,38 x 10 ⁹	7,26 x 10 ³	1,78 x 10 ⁴	4,91 x 10 ⁶	
125	4,10 x 10 ¹⁰	3,66 x 10 ⁷	4,02 x 10 ⁹	3,77 x 10 ³	1,77 x 10 ³	2,58 x 10 ⁶	
126	2,79 x 10 ⁹	1,84 x 10 ⁸	3,06 x 10 ⁹	3,08 x 10 ³	4,06 x 10 ³	2,15 x 10 ⁶	
127	1,41 x 10 ¹⁰	4,47 x 10 ⁸	8,06 x 10 ⁹	1,61 x 10 ⁴	5,39 x 10 ⁴	1,09 x 10 ⁷	

6.1.3. Celkové zhodnocení analýzy DGGE + qPCR

Na základě výše provedených analýz, jejímž cílem bylo popsat bakteriální populaci v bacheru jelena evropského v porovnání s chovem této zvěře ve volné přírodě a v oborním

chovu a dále porovnat tyto dvě populace jelenů s populací daňka skvrnitého žijícího v oborním chovu jsme došli k závěru, že nebyly prokázány žádné signifikantní odlišnosti jednotlivých populací.

K těmto výsledkům jsme došli na základě výsledků z denaturační gradientové gelové elektroforézy, jejím výstupem byla bakteriální populace, která se skládá z bakteriálních kmenů *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Terrabacteria* a *Cytophaga*, které byly zastoupeny ve všech populacích a u všech vzorků. Největší zastoupení měly kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Stejný trend byl pozorován u dalších volně žijících přežvýkavců (Sundset et al., 2007, 2009, 2010, Grüniger et al., 2014, Li et al., 2015b, Zielinska et al., 2016, Hu et al., 2017, Qian et al., 2017). Mnoho studií na strukturu bakteriální charakteristicky volně žijících přežvýkavců zatím zpracováno nebylo (Hu et al., 2017), je totiž složité výsledky konfrontovat s ostatními autory. Další faktem bylo vysoké zastoupení nekultivovaných druhů bakterií. Jedná se k nekultivované bakterie čeledi *Ruminococcaceae*, nekultivované bakterie rodů *Cytophaga*, *Clostridium*, *Thermogemmatissporales*, *Pseudomonas*, *Prevotella*, *Veillonella* a *Sacharofermentans*. Podobné zastoupení bylo popsáno u sobů (Zielinska et al., 2016), ale i u ovcí (Kittelmann et al., 2014). Nejzajímavějším poznatkem z dostupné literatury je studie Henderson et al. (2013), která osekvenovala 742 vzorků přežvýkavců z celého světa. Tato studie byla zaměřena na rozsáhlé poznání bikrobiomů bakterií a archae v širokém spektru po celém světě. Vzorky byly odebírány jak z volně žijících přežvýkavců v přírodě, tak i hospodářských přežvýkavců žijících v zajetí. Studie došla k závěru, že nejvíce zastoupenými bakteriálními kmeny v mikrobiomu přežvýkavců bez ohledu na druh zvířete jsou kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Zastoupení těchto kmenů mezi jednotlivými druhy zvířat se může odlišovat a to pouze na základě jejich diety. Dále došel k závěru, že součástí struktury bakteriální populace je velké množství nekultivovaných bakterií. Tyto závěry korespondují s výsledky této analýzy, kterou jsme prováděli na jelenech a daňcích.

Dále indexy diverzity neprokázaly na základě statistického testování signifikantní rozdíly v bakteriálních strukturách jednotlivých vzorků zvířat ani mezi skupinami testovaných vzorků. Můžeme tedy dojít k závěru, že bakteriální struktura jednotlivých zvířat má podobnost strukturu, ale liší se v procentuální početnosti jednotlivých druhů bakterií, když nebyla staticky prokázána. Tuto hypotézu podporují dendrogramy založené za podobnosti mezi jednotlivými vzorky (Sundset et al., 2007).

Poslední částí této studie byla kvantifikace neboli denzita celkových bakterií, kmene *Firmicutes*, kmene *Bacteroidetes* a hlavních představitelů celulólytických bakterií

vyskytujících se v bachoru a exkrementech jelenů žijících ve volné přírodě a oboře. Opět jsme zvolili stejný princip, ale do naší studie jsme zahrnuli vzorky pořízené sběrem exkrementů jelenů u jejich krmicích zařízení bezprostředně po jejich nakrmění. Z výsledků vyplývá, že byla prokázána statisticky významná odlišnost kmenů *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a druhu *Ruminococcus albus* u vzorků odebraných z bachoru jelenů žijících ve volné přírodě, kde jejich počty byly signifikantně vyšší na hladině významnosti ($P < 0,05$), než u jelenů žijících v oboře. Tento fakt byl potvrzen i v ostatních studiích zabývajících se studiem mikrobiomů u divokých přežvýkavců (Henderson et. al., 2013; Zielinska et al., 2016). Dále můžeme konstatovat, že kvantita celulolytických bakterií v exkrementech je prokazatelně nižší, než ve vzorcích z bachoru.

6.1.4. Molekulárně genetický screening bakterií v bachoru jelenů pomocí NGS

Cílem této analýzy bylo popsat složení a diverzitu bakteriálního složení v bachoru volně žijících přežvýkavců – volně žijící zvěře, konkrétně jelena evropského, daňka skvrnitého a srnce obecného žijících na území České republiky. Dále jsme zkoumali odlišnosti složení bakteriálních společenstev mezi jednotlivými druhy zvířat i v rámci jednotlivých kusů stejného druhu.

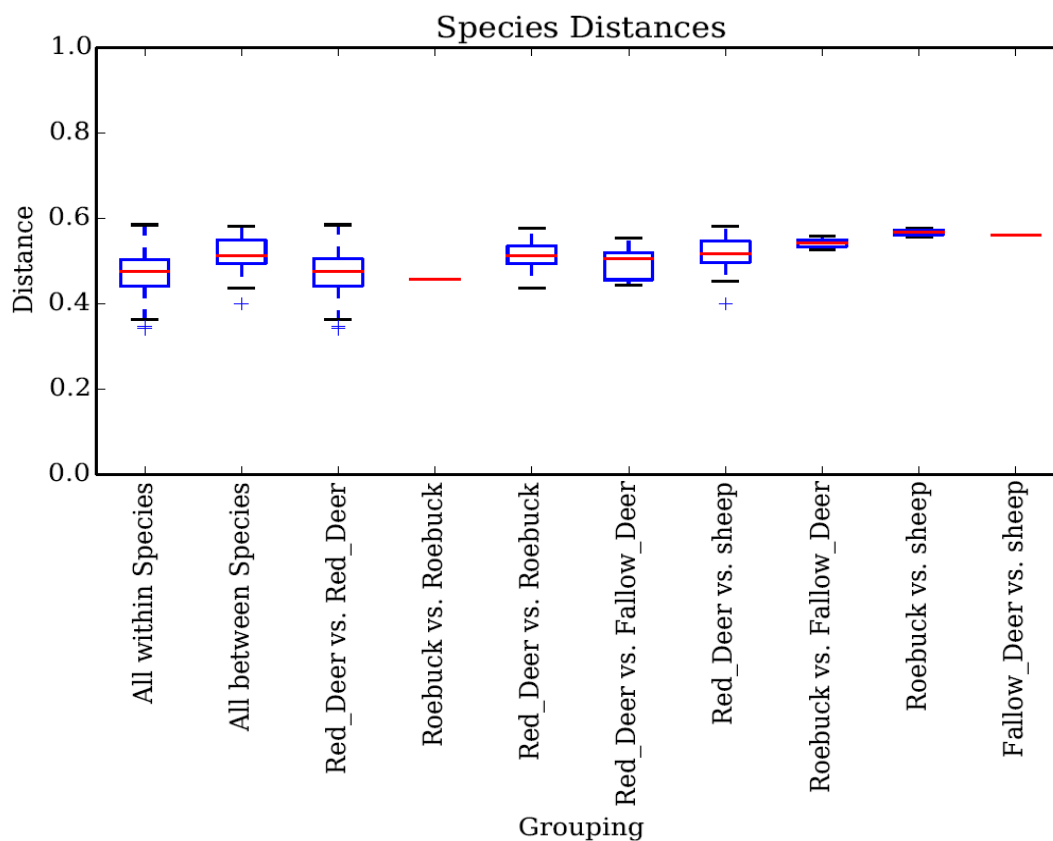
Bylo odebráno 16 vzorků, konkrétně z bachoru jelenů ($n=11$), srnců ($n=2$), daňka ($n=1$) a ovce ($n=1$). Pyrosekvenování bylo provedeno v regionu V1-V3. Sekvence byly zpracovány a analyzovány pomocí softwaru QIIME 1.9.0. Zjištěné chyby v sekvenování byly odstraněny pomocí nastavení softwaru. Po odstranění chyb bylo celkově načteno 88079 sekvencí s průměrem 5872 sekvencí na každý vzorek, v rozmezí od 3230 do 13985. Tyto sekvence mají medián 4920 a byly přiděleny do 524 operačních taxonomických jednotek (OTUS) založených na 97 % podobnosti. Bakteriální komunitní rozmanitost byla měřena u jelenů, srnců, daňka a ovce pomocí Shannonova indexu a inverzního Simpsonova indexu. Shannonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 3,36 – 3,90, mezi srnci 3,45 – 3,55, u daňka hodnoty 3,54 a u ovce hodnoty 3,69. Simpsonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 0,82 – 0,90, mezi srnci 0,83 – 0,84 (tabulka 17). Oba indexy ukázaly, že bakteriální komunitní rozmanitost se mezi jednotlivými jeleny a srnci neliší (Mann Whitney test, $P < 0,05$) a neliší se ani v porovnání mezi skupinami zvířat jeleni, srnci, daňka a ovce. Dále byly měřeny indexy bohatosti (Richness) a indexy rovnoměrnosti (Evenness). Index bohatosti dosahoval hodnot u jelenů 60,0 – 90,0, u srnců 55,0 – 60,0, u daňka 61,0 a u ovce 76,0. Index rovnoměrnosti dosahoval hodnot u jelenů 0,54 – 0,63, u srnců 0,57 – 0,61, u daňka 0,60 a u ovce 0,59 (tabulka 17). Oba indexy ukázaly, že bakteriální

komunitní rozmanitost se mezi jednotlivými jeleny a srnci neliší (Mann Whitney test, $P < 0,05$) a neliší se ani v porovnání mezi skupinami zvířat jeleni, srnci, daněk a ovce.

Tabulka 17: Indexy diverzity (Shannon, Simpson, Evenness a Richness) stanovené u jelenů, srnců, daňka žijícím ve volnosti a jedné ovce z farmového chovu

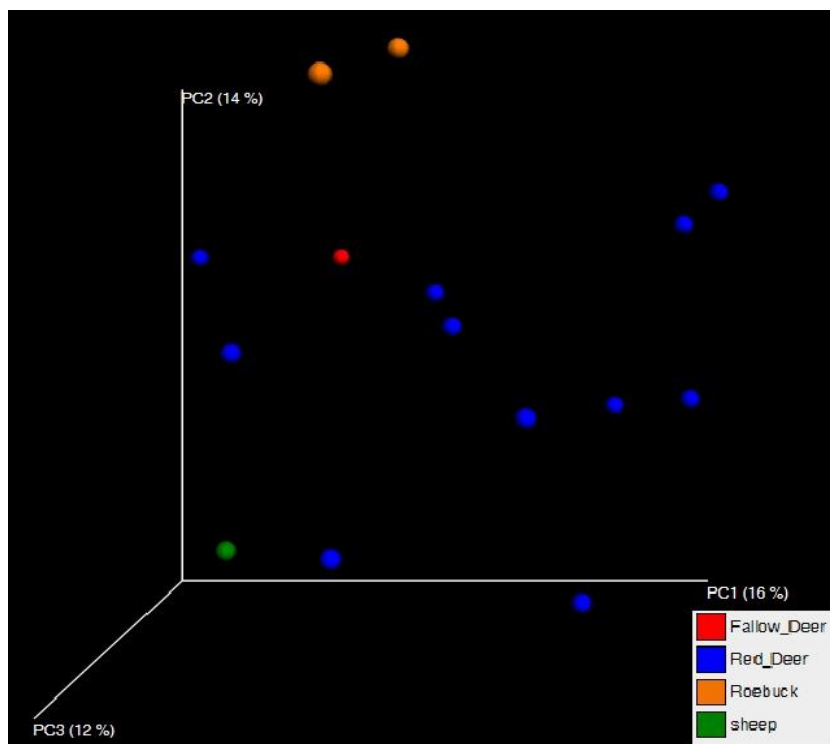
Vzorek	OTU	Shannon	Simpson	Richness	Evenness
Jelen 1	3230	3.63	0.83	68.0	0.60
Jelen 2	3592	3.60	0.84	65.0	0.60
Srnc 1	4041	3.55	0.84	55.0	0.61
Jelen 3	4117	3.70	0.89	67.0	0.61
Jelen 4	4609	3.36	0.82	74.0	0.54
Jelen 5	4703	3.44	0.84	73.0	0.56
Srnc 2	4879	3.45	0.83	68.0	0.57
Jelen 6	4962	3.53	0.84	89.0	0.55
Jelen 7	5015	3.90	0.90	76.0	0.62
Jelen 8	5465	3.87	0.90	87.0	0.60
Jelen 9	5571	3.68	0.88	65.0	0.61
Jelen 11	6644	3.72	0.88	60.0	0.63
Daněk 1	7561	3.54	0.87	61.0	0.60
Jelen 12	9705	4.2	0.89	87.0	0.63
Ovce1	13985	3.69	0.86	76.0	0.59

Po porovnání alfa diverzity (tabulka 17) mezi jednotlivými zvířaty a skupinami zvířat jsme dále zkoumali beta diverzitu mezi jednotlivými skupinami. Porovnávali jsme diverzitu bakterií mezi jednotlivými skupinami zvířat. Ve skupině jelenů, srnců a mezi skupinami navzájem i mezi daněm a ovci. Nejprve jsme počítali na základě shlukování vzorků Jaccard index na základě 97 % podobnosti pro odhad odlišnosti bakteriálních společenstev (obrázek 19).



Obrázek 19: Beta diverzita mezi jednotlivými skupinami zvířat zkoumanými pomocí Jaccardova indexu s mírou podobnosti 97 %, pro odhad diferencí mezi bakteriálními komunitami jednotlivých skupin zvířat

Pomocí principal coordinate analysis (PCoA) jsme vizualizovali vzdálenosti mezi jednotlivými zvířaty (obrázek 20). Obě analýzy prokázaly, že vzorky jednotlivých jelenů mají značnou variabilitu v procentuálním zastoupení jednotlivých druhů bakterií. Dále bylo prokázáno, že srnci jsou sdružené a oddělené od ostatních vzorků. Tudíž mají odlišnou variabilitu v jak procentuálním zastoupení jednotlivých druhů bakterií tak v členství jednotlivých druhů bakterií.

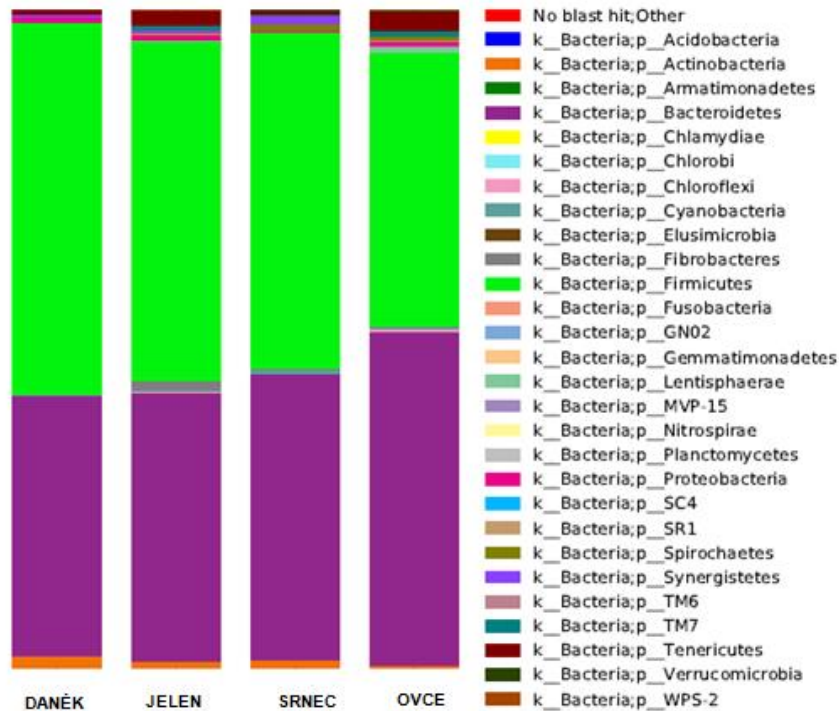


Obrázek 20: Principal coordinate analysis (analýza PCoA) na základě příslušnosti jednotlivých vzorků ke komunitám bakterií na základě Jaccardova indexu. Modré tečky představují jeleny, oranžové představují srnce, červená představuje daňka a zelená představuje ovci. Vzdálenosti mezi tečkami na ploše představuje relativní odlišnosti v komunitní příslušnosti jednotlivých vzorků

Struktura bakteriální populace

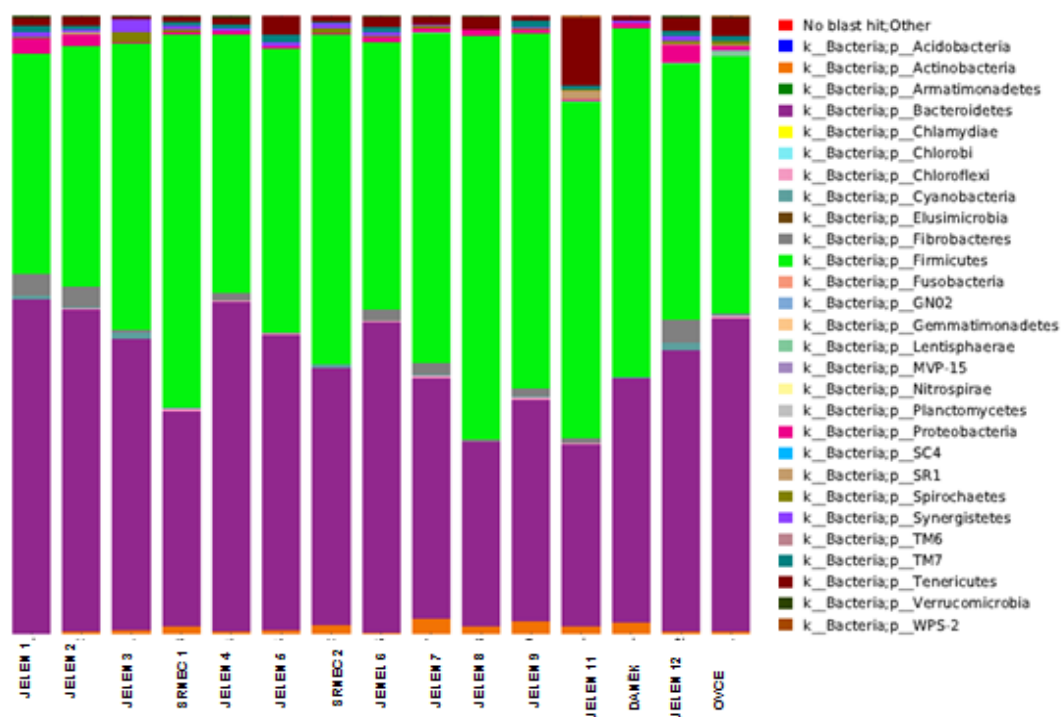
Taxonomická analýza vzorků odebraných z bachoru ukázala, že bakteriální bachorová populace se skládá celkově z 21 bakteriálních kmenů, 30 tříd, 60 řádů, 117 čeledí a 197 rodů (obrázek 21). Z celkových bakteriálních sekvencí 50,1 % sekvencí patří do bakteriálního kmene *Firmicutes*. Druhým nejhojnějším kmenem je s 43,6 % *Bacteroidetes*. Dalšími kmene jsou 1,6 % patřící do *Tenericutes*, 1,2 % *Actinobacteria*, 0,7 % *Proteobacteria*, 0,5 % *Fibrobacteres*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, 0,4 % TM7, 0,3 % *Cyanobacteria*, 0,2 % *Chloroflexi*, *Lentisphaerae*, 0,1 % SR1 a téměř nulovém zastoupení kmene 0,0 % *Acidobacteria*, *Chlamydiae*, *Elusimicrobia*, GN02, MVP-15, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* a WPS-2. V případě porovnání jednotlivých detekovaných bakteriálních sekvencí v rámci jednotlivých druhů zvířat a skupin zvířat, bakteriální kmen *Firmicutes* tvoří ve skupině jelenů podíl 51,5 %, ve skupině srnců 51,1 %, u daňka 56,3 % a u ovce 41,6 % celkových sekvencí. Kmen *Bacteroidetes* tvoří ve skupině jelenů podíl 40,9 %, ve skupině srnců 43,4 %, u daňka 39,7 % a u ovce 50,5 % sekvencí. Kmen *Tenericutes* tvoří ve skupině jelenů podíl 2,3 %, ve skupině srnců 0,6 %, u daňka 0,7 % a u ovce 3,0 % sekvencí. Kmen *Actinobacteria* tvoří ve skupině jelenů podíl 1,1 %, ve skupině srnců 1,3 %, u daňka 1,8 % a u ovce 0,6 % sekvencí. Kmen *Proteobacteria* tvoří ve skupině jelenů podíl 1,0 % (0,3 % -

2,8 %), ve skupině srnců 0,2 % (0,2 % - 0,2 %), u daňka 0,9 % a u ovce 0,7 % sekvencí. Ostatní kmeny bakterií jako *Fibrobacteres*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, TM7, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Lentisphaerae* a SR byly u jednotlivých zvířat zastoupeny v minimálních množstvích (0,0 % - 0,5 %).



Obrázek 21: Složení bakteriální populace na bázi kmenů mezi jednotlivými skupinami zvířat. Sloupce vyjadřují procentuální zastoupení sekvencí přiřazených ke kmenům bakterií, které jsou uvedeny v legendě

Druhy, které se vyskytují u všech přežvýkavců, jsou nekultivované bakterie řádu *Bacteroidales*, rod *Prevotella*, nekultivované bakterie čeledi *Prevotellaceae*, rod *Paludibacter*, rod *Fibrobacter*, nekultivované bakterie řádu *Clostridiales*, nekultivované bakterie čeledi *Lachnospiraceae*, rod *Blautia*, rod *Butyrivibrio*, rod *Clostridium*, rod *Coprococcus*, rod *Eubacterium*, nekultivované bakterie čeledi *Ruminococcaceae*, rod *Ruminococcus* a rod *Selemonas*. Tyto druhy se vyskytují u všech přežvýkavců, které byly podrobeny této analýze (obrázek 22).



Obrázek 22: Diverzita jednotlivých bakteriálních druhů ve zkoumaných vzorcích

Nekultivované bakterie řádu *Bacteroidales* se vyskytují v největším zastoupení u ovce 20,3 %, v nejmenším zastoupení u srnců 4,9 %, u daňka 16,7 % a u jelenů 11,3 %. Nekultivované bakterie řádu *Clostridiales* se vyskytují v největším zastoupení u daňka 13,0 %, v nejmenší míře srnců 6,0 %, u jelenů 11,2 % a u ovce 11,9 %. Na úrovni čeledi má největší zastoupení čeleď nekultivovaných bakterií *Lachnospiraceae*, v největším zastoupení byla daňka 11,8 %, v nejmenším u ovce 5,0 %, jeleni a srnci měli stejné zastoupení sekvencí 11,2 %. Další čeledí se stejným zastoupením jako *Lachnospiraceae* je čeleď nekultivovaných bakterií *Ruminococcaceae*. Největší zastoupení u daňka 14,2 %, nejmenší u srnců 6,8 %, u jelenů 7,9 % a u ovce 10,3 %. Nejmenší zastoupení na úrovni čeledi má čeleď nekultivovaných bakterií *Prevotellaceae*. Největší zastoupení mají jeleni 2,9 %, nejmenší zastoupení mají srnci 1,4 %, ovce 2,3 % a daněk 1,8 %. Na úrovni rodu má největší zastoupení rod *Prevotella*, která měla největší zastoupení u srnců 35 %, nejmenší zastoupení měl daněk 21,2 %, ovce 25,6 % a jeleni 24,9 %. Druhým rodem s největším podílem sekvencí je rod *Seimonas*, který byl nejvíce zastoupen u srnců v 10,6 % sekvencí, nejmenší zastoupení měl daněk 4,0 %, ovce 4,1 % a jeleni 4,3 % (1,2 % - 9,4 %). Dalším rodem je rod *Ruminococcus*, nejvíce zastoupený u jelenů 5,5 %, nejméně u daněk 1,2 %, u srnce 3,7 % a ovce má 2,1 %. Rod *Coprococcus* byl nejvíce zastoupen u srnců 3,4 %, nejméně u ovce 0,9 %, daněk má 2,9 % a jeleni 2,1 %. Dalším rodem je rod *Paludibacter*, který měl největší

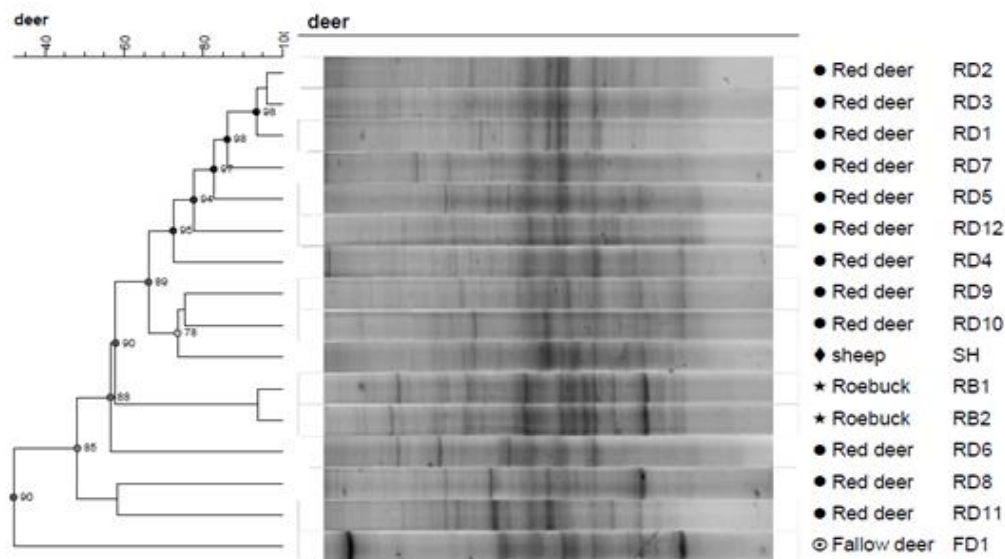
zastoupení u ovce 2,3 %, téměř nulové u daňka 0,1 %, u srnců 2,1 % a u jelenů 1,6 %. Rod *Butyrivibrio* byl nejvíce zastoupen u jelenů 2,8 %, nejméně u ovce 0,8 %, srnců 1,6 % a daňka 1,8 %. Rod *Blautia* byl nejvíce zastoupen u srnců 2,6 %, nejméně u ovce 0,6 %, u daňka 1,2 % a u jelenů 1,7 %. Rod *Eubacterium* potom u daňka 1,7 %, u ovce 0,1 %, u srnce 0,1 % a u jelenů 0,7%. Rod *Clostridium* byl nejvíce zastoupen u daňka 0,6 %, nejmenší zastoupení u ovce 0,1 %, u srnců 0,3 % a u jelenů 0,7 %. Posledním rodem, který se vyskytuje u všech zvířat, je rod *Fibrobacter*. Největší zastoupení má u jelenů 1,4 %, nejmenší zastoupení má u daňka 0,1 %, u srnců 0,2 % a ovce 0,2 % (obrázek 22).

Zajímavým poznatkem celé této analýzy je fakt, že 45,8 % celkových sekvencí je přiřazeno nekultivovaným bakteriím řádu *Bacteroidales*, *Clostridiales*, čeledi *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* a *Ruminococcaceae*. Dále byla zjištěna značná variabilita v počtech jednotlivých sekvencí mezi jednotlivými druhy zvířat. Nejvíce odlišné byly počty sekvencí u srnců vykazující vysokou variabilitu počtu sekvencí přiřazených jednotlivým druhům bakterií, především nekultivovaným bakteriím řádu *Bacteroidales*, *Clostridiales*, čeledi nekultivovaných *Lachnospiraceae*, nekultivovaných *Ruminococcaceae*, rodu *Prevotella*, *Ruminococcus* a *Selemonas*. Toto zjištění také prokazuje analýza binary Jaccard, která byla popsána výše. V případě řádu nekultivovaných bakterií řádu *Bacteroidales* byla zjištěna vysoká variabilita počtu sekvencí mezi jednotlivými druhy zvířat. Srnci mají množství sekvencí 4,9 %, jeleni 11,3 %, daněk 16,7 % a ovce 20,3 %. Stejný trend je prokázán u sekvencí nekultivovaných bakterií řádu *Clostridiales*. V tomto případě srnci mají 6,0 %, jeleni 11,2 %, daněk 13% a ovce 11,9 %. V případě nekultivovaných bakterií čeledi *Ruminococcaceae* dosahují počty sekvencí u srnců 6,8 %, u jelenů 7,9 %, u daňka 14,2 % a u ovce 10,3 %. U nekultivovaných bakterií čeledi *Lachnospiraceae* počty sekvencí dosahují u srnců 11,3 %, u jelenů 11,2 %, u daňka 11,8 % a u ovce 5,0 %. V případě rodu *Prevotella* dosahují počty sekvencí u srnců 35,0 %, u daňka 21,2 %, u jelenů 24,9 % a u ovce 25,6 %. V případě rodu *Ruminococcus* má největší množství sekvencí daněk 14,2 %, ovce 10,3 %, jeleni 7,9 % a nejméně mají srnci. Poslední významné rozdíly v počtech přiřazených sekvencí byly pozorovány u rodu *Selemonas*. Největší zastoupení mají srnci (10,6 %), jeleni mají 4,3 %, daněk 4,0 % a ovce 4,1%.

6.1.4.1. DGGE analýza a indexy diverzity

Stejných 15 vzorků jako v předchozí analýze NGS sekvenování z bachoru jelenů (n=11), srnců (n=2), daňka (n=1) a ovce (n=1) bylo podrobena analýze pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy, která byla vyhodnocena pomocí softwaru Bionumerics

7.2.1, čímž byly detekovány jednotlivé bandy (obrázek 23) a sestaven dendrogram na základě UPGMA s Pearsonovou korelací, diverzita jednotlivých vzorků byla stanovena na základě principal coordinate analysis, na základě vzdáleností jednotlivých jednotek podle Jaccardova indexu (obrázek 24).



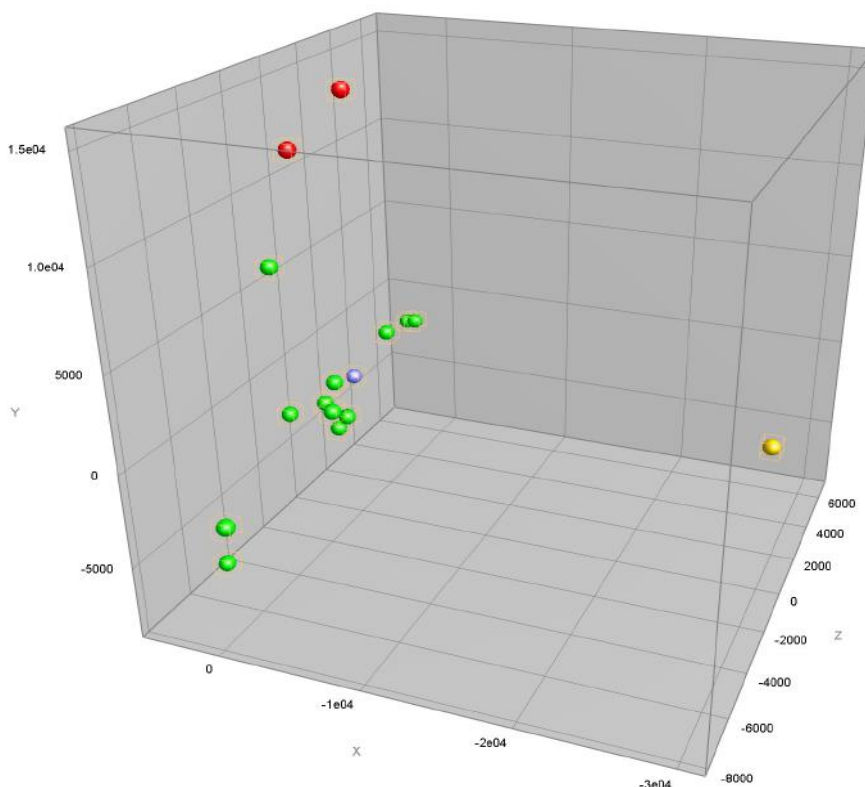
Obrázek 23: DGGE profily bakteriální 16S rDNA genových fragmentů amplifikovaných za použití celkové genomové DNA extrahované ze vzorků obsahu bachoru a jejich odpovídající klastrové analýzy. Dendrogram byl také sestaven pomocí UPGMA s korelací Pearsonův. Vzorky jsou označeny. RD – jelen, RB – srnec, FD – daněk a SH – ovce

Bakteriální komunitní rozmanitost byla měřena u jelenů, srnců, daňka a ovce pomocí indexů alfa diverzity (tabulka 18), za pomoci Shannonova indexu a inverzního Simpsonova indexu. Shannonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 2,74 – 3,12, mezi srnci 2,75 – 2,89, u daňka hodnoty 2,47 a u ovce hodnoty 2,59. Simpsonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 0,51 – 0,79, mezi srnci 0,65 – 0,77. Oba indexy ukázaly, že bakteriální komunitní rozmanitost se mezi jednotlivými jeleny a srnci neliší (Mann Whitney test, $P < 0,05$) a neliší se ani v porovnání mezi skupinami zvířat - jeleni, srnci, daněk a ovce. Dále byly měřeny index bohatosti (Richness) a index rovnoměrnosti (Evenness). Richness index dosahoval hodnot u jelenů 91,0 – 141,0, u srnců 91,0 – 96,0, u daňka 60,0 a u ovce 95,0. Evenness index dosahoval hodnot u jelenů 0,70 – 0,78, u srnců 0,71 – 0,75, u daňka 0,79 a u ovce 0,70. Oba indexy ukázaly, že odlišnost bakteriální komunitní rozmanitosti mezi jednotlivými jeleny a srnci nebyla statisticky prokázána (Mann Whitney test, $P < 0,05$) a neliší se ani v porovnání mezi skupinami zvířat jeleni, srnci, daněk a ovce.

Tabulka 18: Indexy alfa diverzity u vzorků z analýzy DGGE

Vzorek	Shannon	Simpson	Richness	Evenness
JELEN 1	2.74	0.79	91.00	0.73
JELEN 2	2.86	0.72	112.00	0.70
JELEN 3	2.93	0.66	119.00	0.75
JELEN 4	3.12	0.51	124.00	0.78
JELEN 5	3.04	0.56	141.00	0.72
JELEN 6	2.97	0.60	116.00	0.70
JELEN 7	2.78	0.77	107.00	0.74
JELEN 8	2.90	0.68	103.00	0.75
JELEN 9	2.97	0.61	130.00	0.72
JELEN 11	2.93	0.65	107.00	0.72
JELEN 12	2.97	0.61	132.00	0.75
SRNEC 1	2.89	0.65	96.00	0.75
SRNEC 2	2.75	0.77	91.00	0.71
DANĚK	2.47	0.72	60.00	0.79
OVCE	2.59	0.90	95.00	0.70

Na základě analýzy a detekování jednotlivých bandů na gelu pomocí principal coordinate analysis of the community membership using Jaccard distance bylo zjištěno (obrázek 24), že největší bakteriální diverzitu v porovnání mezi jednotlivými vzorky má daněk a srnci. Na základě analýzy je zřetelné, že jednotlivé vzorky jelenů a ovce jsou shlukovány víceméně v jedné oblasti, a mají podobnou bakteriální diverzitu i počty bakterií. Srnci se vyznačují tím, že se liší bakteriální diverzitou, ne počty jednotlivých bakterií. Největší rozdíly jak v diverzitě jednotlivých druhů, tak i v počtech jednotlivých bakteriálních kmenů má daněk, který se nachází daleko od ostatních vzorků jednotlivých zvířat



Obrázek 24: Principal coordinate analysis: Analýza členství jednotlivých vzorků v komunitách podle profilu DGGE. Zelené tečky představují jelena, červené tečky představují jelena, žluté jelena a modré ovce. Vzdálenosti bodů představují relativní rozdíly v členství v komunitě

6.1.4.2. Kvantifikace vzorků pomocí qPCR

Hustotu mikrobiální populace jsme stanovili pomocí quantitative real-time PCR (tabulka 19). Zaměřili jsme se na hustotu celkových bakterií a především na hlavní celulólytické představitele bakterií jako *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus* (jednotky – počet buněk na g^{-1} vzorku). Hustotu jsme stanovili u stejných vzorků, jako v případě předchozích analýzách (jelena, srnci, daňka a ovce). Analýza ukázala, že hustota celkových bakterií v bachoru jelenů dosahuje hodnot $1,04 \times 10^9$ – $1,49 \times 10^{10}$, u srnců $5,11 \times 10^9$ – $6,56 \times 10^9$, u daňka $9,93 \times 10^8$ a u ovce $5,43 \times 10^9$. V případě hustoty bakterie *Fibrobacter succinogenes* dosahovala v případě jelenů hodnot $1,35 \times 10^7$ – $1,83 \times 10^8$, u srnců $5,11 \times 10^6$ – $3,28 \times 10^7$, u daňka $9,93 \times 10^5$ a u ovce $1,09 \times 10^7$. Jako dalším druhem bakterie, u které jsme stanovovali hustotu je *Ruminococcus albus*, jehož hustota dosahuje v případě jelenů hodnot $1,87 \times 10^6$ – $7,82 \times 10^7$, v případě srnců $8,75 \times 10^6$ – $1,55 \times 10^7$, v případě daňka $1,12 \times 10^6$ a v případě ovce $9,42 \times 10^6$. Posledním druhem bakterie, u které jsme stanovili hustotu je *Ruminococcus flavefaciens*, jehož hustota dosahuje hodnotu u jelenů $1,37 \times 10^5$ – $3,34 \times 10^7$, u srnců $4,53 \times 10^6$ – $7,77 \times 10^6$, u daňka $5,88 \times 10^4$

a u ovce $1,21 \times 10^7$. Na základě statistické analýzy bylo prokázáno, že hustota bakterií rodu *Fibrobacter succinogenes* a *Ruminococcus flavefaciens* u jelenů, je signifikantně vyšší než u ostatních druhů zvířat na hladině významnosti ($P < 0,05$). U ostatních zvířat nebyly prokázány statistiky významné rozdíly mezi jednotlivými populacemi bakterií.

Tabulka 19: RT-PCR výsledky hustoty celkových bakterií, hlavních představitelů celulolytických bakterií, jako jsou *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus* (jednotky - počet buněk g^{-1})

Vzorek	Celkové bakterie	<i>R. albus</i>	<i>R. flavefaciens</i>	<i>F. succinogenes</i>
JELEN 1	$5,10 \times 10^9$	$4,05 \times 10^6$	$1,20 \times 10^7$	$1,83 \times 10^8$
JELEN 2	$5,14 \times 10^9$	$9,67 \times 10^6$	$1,67 \times 10^7$	$1,70 \times 10^8$
JELEN 3	$4,53 \times 10^9$	$1,87 \times 10^6$	$4,72 \times 10^6$	$6,79 \times 10^7$
JELEN 4	$1,04 \times 10^9$	$3,33 \times 10^6$	$1,37 \times 10^5$	$1,35 \times 10^7$
JELEN 5	$8,56 \times 10^9$	$1,51 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$
JELEN 6	$6,57 \times 10^9$	$7,82 \times 10^7$	$8,45 \times 10^6$	$1,12 \times 10^8$
JELEN 7	$5,50 \times 10^9$	$1,89 \times 10^6$	$1,37 \times 10^7$	$1,05 \times 10^8$
JELEN 8	$4,97 \times 10^9$	$3,86 \times 10^6$	$6,68 \times 10^6$	$1,49 \times 10^7$
JELEN 9	$1,49 \times 10^{10}$	$1,62 \times 10^7$	$3,34 \times 10^7$	$1,79 \times 10^8$
JELEN 11	$6,83 \times 10^9$	$7,24 \times 10^6$	$6,31 \times 10^6$	$5,46 \times 10^7$
JELEN 12	$6,58 \times 10^9$	$5,45 \times 10^6$	$1,70 \times 10^7$	$2,43 \times 10^8$
SRNEC 1	$6,56 \times 10^9$	$1,55 \times 10^7$	$7,77 \times 10^6$	$3,28 \times 10^7$
SRNEC 2	$5,11 \times 10^9$	$8,75 \times 10^6$	$4,53 \times 10^6$	$5,11 \times 10^6$
DANĚK	$9,93 \times 10^8$	$1,12 \times 10^6$	$5,88 \times 10^4$	$9,93 \times 10^5$
OVCE	$5,43 \times 10^9$	$9,42 \times 10^6$	$1,21 \times 10^7$	$1,09 \times 10^7$

6.1.4.3. Shrnutí analýzy

Provedené analýzy charakterizovali bakteriální skladbu jelenů, srnců, daňka a ovce. Analýza diverzity byla provedena indexy alfa a beta diverzity z NGS a DGGE. V obou případech bylo prokázáno, že bakteriální komunity nalezené v bachoru divokých přežvýkavců jsou odlišné od sebe navzájem. Mimo jiné analýza více jedinců ukazuje, že kmeny jednotlivých bakterií přítomných v bachoru určitého druhu přežvýkavce jsou stejné, ale relativní podíl těchto bakterií se liší. Tato tvrzení jsou podpořena principal coordinate analysis pomocí Jaccardových indexů. Vysoké hodnoty Shannonova indexu naznačují vysokou druhovou diverzitu ve vzorcích. Dále, bakteriální společenstva ve vzorcích na základě podobných a vysokých hodnot Simpsonova indexu naznačují podobnou bakteriální populaci. Vysoký počet OTUS a vysoké hodnoty indexů mikrobiální diverzity naznačují vysoké zastoupení druhů v testovaných vzorcích. Tato druhová rozmanitost vzorků může být pro

volně žijící přežvýkavce strategií pro přežívání ve volné přírodě, která je závislá na dostupnosti potravy a mění se klimatických vlivů (Henderson et al., 2013). Také jsme porovnávali bakteriální složení bakteriálních komunit v rámci jednotlivých druhů zvířat. Z výsledků vyplývá, že jsme našli značné rozdíly v relativním podílu jednotlivých bakterií mezi druhy přežvýkavců.

V této studii mají největší podíl všech bakteriálních sekvencí na úrovni kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, které představují více jak 93 % celkových sekvencí ve všech druzích zvířat. Dominance těchto kmenů druhů byla prokázána také v jiných studiích u volně žijících přežvýkavců, kteří jsou schopni trávit a využít velké množství potravy ve formě cévnatých rostlin, trav, měchů a lišejníků, pomocí unikátního mikrobiomu v bachoru. (Sundset et al., 2007, 2009, 2010, Grüninger et al., 2015, Li et al., 2015, Zielinska et al., 2016, Hu et al., 2017, Qian et al., 2017). Analýza bakteriálních komunit ve vzorcích daňka, jelena evropského, srnce obecného a ovce představuje zastoupení bakteriální kmene *Bacteroidetes* s dominantními druhy řádu *Bacteroidales*, rodu *Prevotella*, čeledi nekultivovaných *Prevotellaceae*, rodu *Paludibacter*. Druhým kmenem s největším zastoupením je *Firmicutes* s dominantními druhy řádu nekultivovaných *Clostridiales*, čeledi nekultivovaných *Lachnospiraceae*, čeledi nekultivovaných *Ruminococcaceae*, rodu *Blautia*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* a rodu *Selenomas*.

Statisticky významné rozdíly v relativním zastoupením jednotlivých druhů bakterií mezi jednotlivými druhy zvířat jsou prokázány u srnce, kde byly prokázány rozdíly u bakterií nekultivovaných *Bacteroides*, *Prevotella*, nekultivovaných *Clostridiales*, nekultivovaných *Ruminococcaceae* a *Selenomomas*.

Řada studií zaměřených na studium bakteriální komunity u divokých přežvýkavců uvádí, že dominantními kmeny v trávicím traktu jsou *Bacteroides* a *Firmicutes*, které pokryjí více než 90 % veškerých sekvencí bakterií (Sundset et al., 2007; 2009; 2010; Grüninger et al., 2014; Guo et al., 2015; Li et al., 2015; Zielinska et al., 2016; Hu et al., 2017; Qian et al., 2017), což potvrzuje naše zjištění. Další bakteriálních kmeny, které nemají tak vysoké zastoupení sekvencí, které analýza prokázala se podle zmíněných studií vyskytují běžně i ostatních volně žijících přežvýkavců, liší se pouze procentuálním zastoupením sekvencí. Z dostupné literatury jsme zjistili, že dosud nebyla prováděna analýza sekvenování nové generace na jelenech evropských ani na srncích obecných či na daňku skvrnitým. Je velice složité tyto výsledky porovnávat s dostupnou literaturou. Zajímavým zjištěním této studie je velké množství sekvencí patřící nekultivovaným bakteriálním druhům jako *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* a *Ruminococcaceae*, celkově jde o více než

45 % z celkového počtu sekvencí. Stejný jev byl pozorován ve studiích provedených na bachorových obsazích sobů (Sundset et al., 2007), jelenů wapiti (*Cervus canadensis*), jelenců běloocasých (*Odocoileus virginianus*) (Grüninger et al., 2014) a kabarů (*Moschus berezovskii*) (Hu, 2017). Nejvíce zastoupeným druhem bakterií v naší studii je rod *Prevotella*, stejně jako u jelenů yakard (*Cervus elaphus yarkandensis*) (Qian et al., 2017) a jelenů wapiti (*Cervus canadensis*), jelenců běloocasých (*Odocoileus virginianus*) (Grüninger et al., 2014) a kabarů (*Moschus berezovskii*) (Hu, 2017). Dalšími druhy bakterií jsou *Blautia*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter* a *Selenomonas*. Rod *Selenomonas* má druhé největší zastoupení v počtu sekvencí. Podle Sawanona et al. 2011 bakterie *Selenomonas ruminantium* je schopna v kokultuře s *Fibrobacter succinogenes* napomáhat a urychlovat štěpení vlákniny v bachoru za zvýšené produkce propionátu. V našem případě mají největší zastoupení rodu *Selenomonas* srnci ve dvojnásobném množství oproti ostatním druhům přežvýkavců. Třetím nejvíce zastoupeným rodem bakterií je rod *Ruminococcus*. Největší zastoupení rodu *Ruminococcus* mají jeleni, téměř o polovinu více než ostatní druhy zvířat, stejně je i v případě rodu *Fibrobacter*. Tyto závěry potvrzuje analýza vzorků qPCR. To může být způsobeno tím, že jelen patří mezi potravní oportunisty a potravu si vybírá, tudíž jeho složení potravy obsahuje velké množství celulosy, které v bachoru štěpí především celulolytické druhy bakterií *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Fibrobacter succinogenes* (Koike and Kobayashi, 2001; Grüninger et al., 2014). Na tyto bakterie jsme se zaměřili pro doplnění přesných počtů jednotlivých druhů celulolytických bakterií. Tyto výsledky se shodují i s publikovanými studiemi (Khejornsart et al., 2011), jejichž počty potvrzují výsledky next generation sequencing, že počty jednotlivých celulolytických druhů bakterií jsou u jelenů vyšší než u ostatních druhů. To potvrzuje hypotézu o složení potravy jelena evropského a jeho potravního oportunismu. V porovnání výsledků naší studie se studiemi prováděných pomocí stejných metod na domácích přežvýkavcích jsme došli k závěru, že složení bakteriálních komunit na úrovni kmenů je podobné jako u volně žijících přežvýkavců. Procentuální zastoupení sekvencí jednotlivých bakterií je odlišné. Podle studií zaměřených na dobytek jsou dominantními kmeny bakterií kmen *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Raphael Barbeta de Jesus et al., 2015; Hess et al., 2011), ale oproti volně žijícím přežvýkavcům mají větší zastoupení kmene *Bacteroides* než *Firmicutes*. Tuto skutečnost potvrzuje Qian et al. (2017) ve své studii na ovcích. Tento jev byl také popsán u sobů (Sundset et al. 2007; Zielinska et al., 2017). Tato skutečnost je potvrzena i naší studií, kde podíl *Bacteroides* převažuje nad *Firmicutes* u ovce. Dalším faktem, který potvrzuje podobnost bakteriálního složení je fakt, že u skotu se vyskytuje značné množství

nekultivovaných bakterií, jak u *Bacteroidetes*, tak u *Firmicutes* (Raphael Barbeta de Jesus et al., 2015). Struktura bakteriální populace je závislá na řadě faktorů, jako jsou antibiotika, pufrý, změna stravy, environmentální stres a infekční onemocnění, které mění stabilitu a strukturu bakteriálních populací (Kumar et. al., 2009), proto zde hovoříme pouze o relativních porovnáních a změnách mikrobiomů jednotlivých druhů zvířat.

6.1.5. Molekulárně genetický screening bakterií v bacheru přežvýkavců pomocí NGS

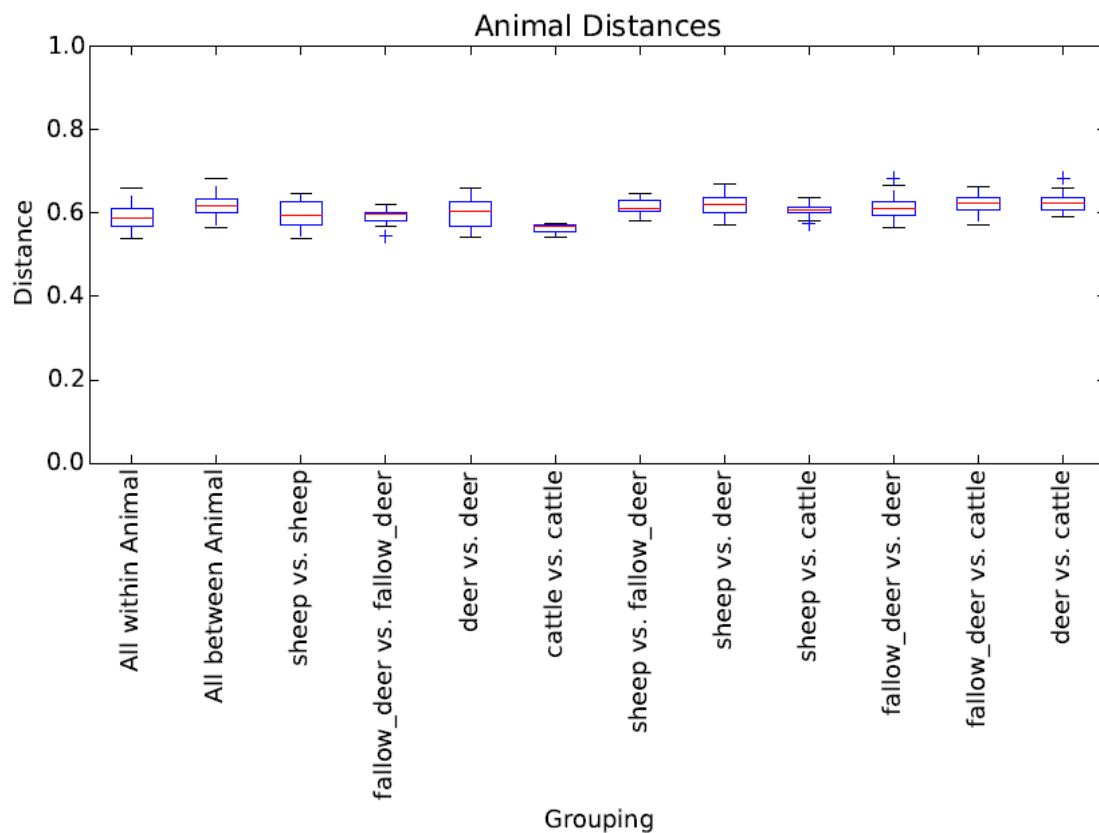
Předpokládaným výsledkem této analýzy bylo popsat složení a diverzitu bakteriálního populace vyskytující se v bacheru volně žijících přežvýkavců, konkrétně jelena evropského a daňka skvrnitého, v konfrontaci s domácími přežvýkavci, konkrétně tura domácího a ovce žijícími na území České republiky. Dále jsme zkoumali odlišnosti složení bakteriálních společenstev mezi jednotlivými druhy zvířat i v rámci jednotlivých kusů stejného druhu. Odebráno bylo 20 vzorků obsahů bacheru, přesněji z bacheru jelenů (n=6), daňků (n=6), turů (n=4) a ovcí (n=4). Vzorky byly podrobeny pyrosekvenování, které bylo provedeno v regionu V1-V3. Sekvence byly zpracovány a analyzovány pomocí softwaru QIIME 1.9.0. Zjištěné chyby při sekvenování byly odstraněny pomocí naprogramování softwaru. Po odstranění chyb bylo celkově načteno 477662 sekvencí s průměrem 23883 sekvencí pro každý vzorek, v rozmezí od 524 do 180071. Bakteriální komunitní rozmanitost u jednotlivých vzorků byla měřena u jelenů, daňků, ovcí a turů pomocí Shannonova indexu, Simpsonova indexu, Chao 1 indexu, richness indexu a indexu evennes.

Tabulka 20: Indexy alfa diverzity jednotlivých vzorků zvířat odebraných z bacheru

Vzorek	Zvíře	Observed OTU	Indexy diverzity				
			Shannon	Simpson	Chao1	Richness	Evennes
6	jelen	2233	10,22	0,98	3288,41	0,97	0,92
7	jelen	292	7,72	0,99	682,20	0,99	0,94
9	jelen	463	8,43	0,99	816,39	0,99	0,95
22	jelen	1207	8,53	0,99	1801,22	0,99	0,83
33	jelen	1160	8,98	0,98	1943,73	0,99	0,88
40	jelen	1648	9,69	0,97	2548,86	0,98	0,91
73	daněk	2120	9,52	0,98	3419,24	0,98	0,86
75	daněk	1337	9,22	0,98	2178,22	0,98	0,89
76	daněk	15772	10,78	0,99	17326,34	0,91	0,77
77	daněk	13390	11,12	0,97	15209,50	0,91	0,81
78	daněk	4334	9,74	0,99	5132,62	0,97	0,81
80	daněk	1125	9,17	0,97	1903,75	0,98	0,90
93	ovce	826	8,97	0,98	1541,83	0,99	0,93
94	ovce	8767	11,15	0,98	10084,98	0,92	0,85
95	ovce	4844	10,60	0,99	6049,83	0,95	0,87
96	ovce	1787	9,50	0,99	2754,12	0,98	0,88
97	kráva	2553	10,14	0,99	3770,02	0,97	0,90
98	kráva	796	8,30	0,98	1456,76	0,99	0,86
99	kráva	1132	9,22	0,98	1840,20	0,98	0,91
100	kráva	4489	10,82	0,97	5843,20	0,95	0,89

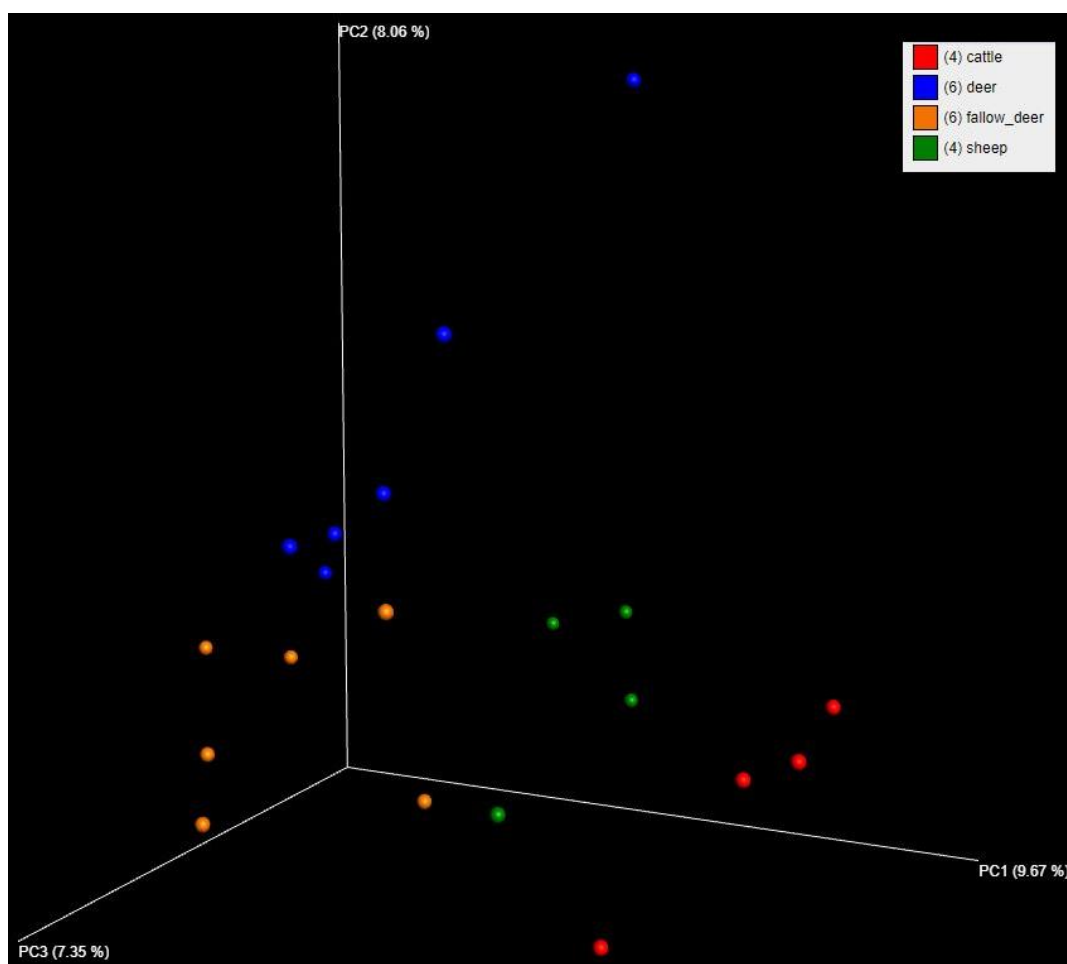
Shannonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 8,43 – 10,22, mezi daňky 9,17 – 11,12, mezi ovci 8,97 – 11,15 a u turů 8,30 – 10,82. Simpsonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 0,98 – 0,99, mezi daňky 0,97 – 0,99, mezi ovci 0,98 – 0,99 a u turů 0,97 – 0,99 (tabulka 20). Shannonův index prokázal, že bakteriální komunitní rozmanitost se mezi jednotlivými jeleny, daňky, ovci a tury ani v porovnání mezi jednotlivými skupinami zvířat neliší (Mann Whitney test, $P < 0,05$). Dále byly měřeny index bohatosti (Richness) a index rovnoměrnosti (Evenness). Richness index dosahoval hodnot u jelenů 97,0 – 99,0, u daňků 91,0 – 98,0, u ovcí 92,0 – 0,99 a u turů 0,95 – 0,99. Evenness index dosahoval hodnot u jelenů 0,83 – 0,95, u daňků 0,77 – 0,90, u ovcí 0,85 – 0,93 a u turů 0,89 – 0,91 (tabulka 20). Oba indexy ukázaly, že bakteriální komunitní rozmanitost se mezi jednotlivými jeleny, daňky, ovci a tury neliší (Mann Whitney test, $P < 0,05$) a neliší se ani v porovnání mezi skupinami zvířat.

Pro porovnání diverzity bakteriálních populací mezi jednotlivými skupinami zvířat jsme použili indexy beta diverzity na základě vážené Unifrac analýzy na základě Jaccardova indexu s podobností 97 % (obrázek 25). Porovnávali jsme možné odlišnosti mezi skupinami jelenů, daňků, ovcí a turů.



Obrázek 25: Vážená UniFrac analýza pro porovnání bakteriálních společenstev identifikovaných ve vzorcích v bachoru na základě Jaccard analýzy 97 % podobnosti

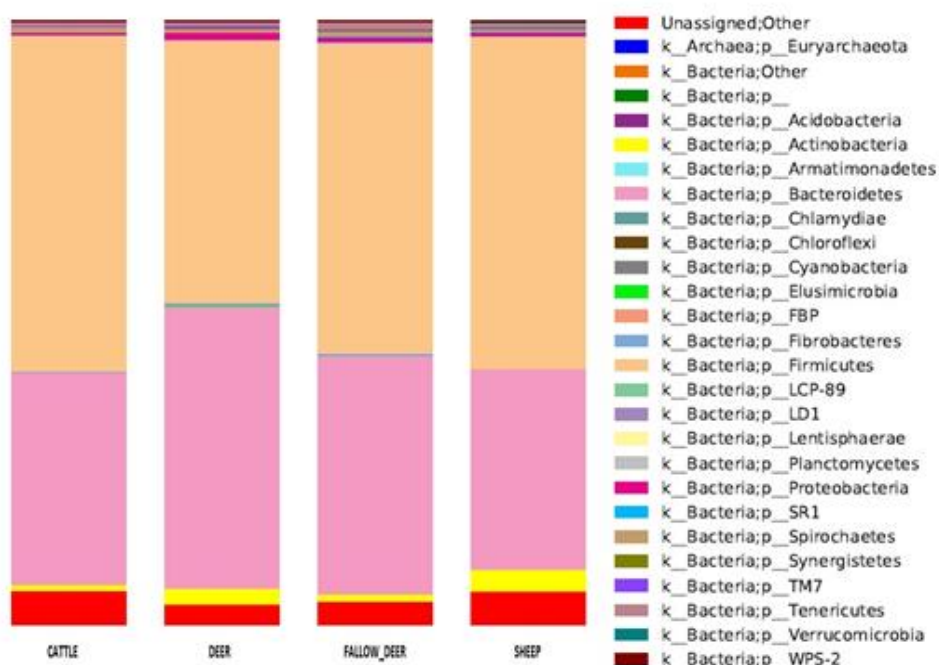
Dále jsme použili pro vizualizaci rozdílů ve vzdálenostech jednotlivých zvířat a jejich diverzity bakteriální populace principal coordinate analýzu (PCoA). Obě analýzy beta diverzity prokázaly, že jednotlivé vzorky mají variabilitu v procentuálním zastoupení bakteriálních populací. Na PCoA (obrázek 26) je zřetelné, jak se jednotlivé vzorky jednotlivých skupin sdružují v hloučku. Tato skutečnost vyjadřuje variabilitu v komunitním složení jednotlivých druhů bakterií.



Obrázek č. 27: Principal coordinate analysis (analýza PCoA) na základě příslušnosti jednotlivých vzorků v komunitách bakterií na základě Jaccardova indexu. Modré tečky představují jeleny, oranžové představují daňky, červené představují tury a zelené představují ovce. Vzdálenosti mezi tečkami na ploše představuje relativní odlišnosti v komunitní příslušnosti jednotlivých vzorků

Struktura bakteriální populace

Taxonomická analýza vzorků odebraných z bachoru ukázala, že bakteriální populace všech testovaných zvířat se skládá z 27 kmenů, 36 tříd, 75 řádů, 154 čeledí a 269 rodů. Největší zastoupení sekvencí má bakteriální kmen *Firmicutes*, který obsahoval 49,3 % celkových sekvencí. Druhým nejhojnějším kmenem je kmen *Bacteroidetes*, kterému náleží 40,9 % sekvencí. Dalšími kmeny určených při analýze jsou kmeny *Actinobacteria* se zastoupením 1,9 % sekvencí, kmen *Proteobacteria* se zastoupením 1,8 %, kmen *Spirochaetes* se zastoupením 0,7 % sekvencí, kmen *Tenericutes* se zastoupením 0,7 % sekvencí, kmen *Fibrobacteres* se zastoupením 0,3 % sekvencí, kmen TM7 se zastoupením 0,3 % sekvencí, kmeny *Planctomycetes*, SR1, *Synergistetes* a *Verrucomicrobia* měli zastoupení sekvencí v desetinách procent celkových sekvencí (obrázek 27).



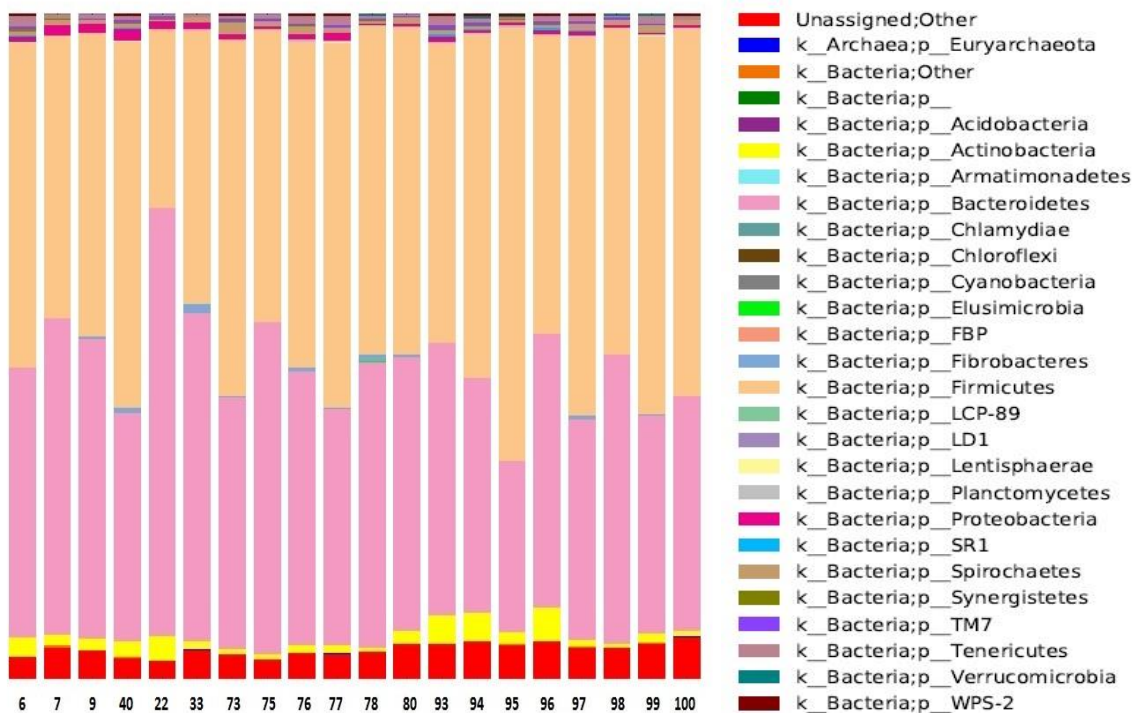
Obrázek 27: Složení bakteriální populace na bázi kmenů mezi jednotlivými skupinami zvířat. Sloupce vyjadřují procentuální zastoupení sekvencí přiřazených ke kmenům bakterií, které jsou uvedeny v legendě

Pokud se podíváme na výsledky jednotlivých kmenů z hlediska zastoupení mezi jednotlivými druhy zvířat (obrázek 27), tak jeleni mají kmen *Firmicutes* zastoupen 43,5 %, daňci 51,1 % , ovce 55,0 % a tuři 55,4 %. Zastoupení kmene *Bacteroidetes* mají jeleni 46,8 %, daňci 39,4 %, ovce 33,2 % a tuři 35,1 %. V případě kmene *Actinobacteria* je zastoupení u jelenů 2,6 %, u daňků 1,2 %, u ovcí 3,5 % a u turů 1,0 %. Kmen *Proteobacteria* je zastoupení u jelenů 1,3 %, u daňků 0,8 %, u ovcí 0,5 % a u turů 0,4 %. Kmen *Tenericutes* je zastoupen u jelenů 0,7 %, u daňků 1,1 %, u ovcí 0,5 % a u turů 0,7 %. Kmen *Spirochaetes* má zastoupení

u jelenů 0,5 %, u daňků 0,9 %, u ovcí 0,4 % a u turů 0,9%. Posledním kmene, který má nějak významné zastoupení je kmen *Fibrobacteres*, který má zastoupení u jelenů 0,4 %, u daňků 0,5 %, u ovcí 0 % a u turů 0,2 %. Zbylé kmeny, jak již bylo zmíněno výše, mají minimální zastoupení v počtech sekvencí.

Porovnání bakteriálních druhů mezi jednotlivými druhy zvířat

Z výsledků vyplývá, že u všech zvířat se vyskytují nekultivované bakterie řádu *Bacteroidales*, rod *Prevotella*, nekultivovaná čeleď *Prevotellaceae*, rod *Fibrobacter*, nekultivované bakterie řádu *Clostridiales*, rod *Clostridium*, nekultivované bakterie čeledi *Lachnospiraceae*, rod *Blautia*, rod *Butyrivibrio*, rod *Coprococcus*, nekultivované bakterie čeledi *Ruminococcaceae*, rod *Ruminococcus*, rod *Succinoclasticum* a rod *Mogibacterium*. Všechny zmíněné druhy bakterií se vyskytují u všech skupin zvířat a i u jednotlivců. V následujícím textu budeme uvádět druhy bakterií od největšího procentuální zastoupení sekvencí k nejmenšímu. Budeme popisovat jednotlivé počty sekvencí mezi skupinami zvířat, tudíž mezi jeleny, daňky, tury a ovcemi (obrázek 28).



Obrázek 28: Diverzita jednotlivých bakteriálních druhů ve zkoumaných vzorcích

Největší zastoupení ze všech druhů celkových sekvencí má rod *Prevotella*, který má největší zastoupení u jelenů 22,5 %, nejmenší u daňků 17,0 %, u turů je zastoupení 21,0 % a ovcí 18,1 %. Druhým nejvíce zastoupeným druhem bakterií jsou nekultivované bakterie řádu *Clostridiales*, který má největší zastoupení sekvencí u daňků 19,3 %, nejmenší u turů 13,6 %, dále u jelenů 15,4 % a u ovcí 17,5 %. Dalším významně zastoupeným bakteriálním druhem jsou nekultivované bakterie řádu *Bacteroidales* s největším zastoupením u jelenů 11,9 %, nejmenším zastoupením u turů 8,2 %, u daňků 11,5 % a ovcí 7,9 %. Nekultivované bakterie čeledi *Ruminococcaceae* mají největší zastoupení u jelenů a ovcí 7,5 %, nejmenší u daňků 7,2 % a u turů 7,3 %. Nekultivovaná čeleď *Lachnospiraceae* má největší zastoupení u ovcí 7,4 %, nejmenší u jelenů 5,0 % a u turů a daňků 5,1 %. Dalším rodem je rod *Butyrivibrio*, který měl největší zastoupení u turů 11,4 %, nejmenší u daňků 2,0 %, poté u ovcí 5,9 % a u jelenů 2,8 %. Nekultivovaná čeleď S24-7, řádu *Bacteroidales* má největší zastoupení u jelenů 6,0 %, nejmenší u daňků 1,2 %, u ovcí 2,0 % a turů 1,6 %. Rod *Ruminococcus* má největší zastoupení u daňků 4,1 %, nejmenší u jelenů 1,2 %, u turů 3,8 % a u ovcí 1,8 %. Nekultivované bakterie čeledi *Coriobacteriaceae* mají největší zastoupení u ovcí 2,8 %, nejmenší u turů a daňků a u jelenů 1,5 %. Rod *Succinivasticum* má největší zastoupení u turů 3,1 %, nejmenší u jelenů 0,5 %, u ovcí 0,8 % a u daňků 1,0 %. Rod *Clostridium* má největší zastoupení 1,4 % u daňků, nejmenší u jelenů a ovcí 0,3 % a turů 0,4 %. Posledním zajímavým rodem v naší analýze je rod *Fibrobacter*, který měl největší zastoupení u daňků 0,5 %, nejmenší u ovcí 0,0 %, u jelenů 0,4 % a u turů 0,2 %.

Zajímavý zjištění z této analýzy je fakt, že téměř polovina, když nepočítáme nepřirazené sekvence, kterých bylo v tomto případě 4,6 % z celkového počtu, tak sekvence byly přiřazeny bakteriím, které jsou nekultivované. Jednalo se o 46,4 % všech sekvencí. Sekvence nekultivovaných bakterií jsou ve všech případech ve větším zastoupení u volně žijících přežvýkavců než u domácích. Tyto sekvence byly přiřazeny nekultivovaným bakteriím řádu *Bacteroidales*, *Bacteroidales* BS11, *Clostridiales*, nekultivovaným bakteriím čeledi *Coriobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*. Největší zastoupení nekultivovaných bakterií měl řád *Clostridiales*, nejmenší *Coriobacteriaceae*.

Variabilita procentuálního zastoupení sekvencí mezi jednotlivými skupinami zvířat bez ohledu na statistickou významnost byla prokázána u nekultivovaných bakterií řádu *Bacteroidales*, kde byly zjištěny počty sekvencí u jelenů 11,9 %, u daňků 11,5 %, u ovcí 7,9 % a u turů 8,2 %. Další variabilita pozorována u nekultivovaných bakterií čeledi S24-7, řádu *Bacteroidales*, kde počty sekvencí u jelenů dosahovaly 6,0 %, u daňků 1,2 %, u ovcí 2,0 % a u turů 1,6 %. Dále u rodu *Ruminococcus* bylo zastoupení sekvencí u daňků 4,1 %, u turů 3,8

%, u ovcí 1,8 % a u jelenů 1,2 %. Dalším rodem byl rod *Succiniclasticum*, jehož zastoupení bylo u turů 3,1 %, u daňků 1,0 %, u ovcí 0,8 % a u jelenů 0,5 %. Největší variabilita byla pozorována u rodu *Butyrivibrio*, kde tuři měli zastoupení sekvencí 11,4 %, ovce 5,9 %, jeleni 2,8 % a daňci 2,0 %.

6.1.5.1. Kvantifikace vzorků pomocí qPCR

Hustotu mikrobiální populace jsme stanovili pomocí quantitative real-time PCR (tabulka 21). Zaměřili jsme se na hustotu celkových bakterií a především na hlavní celulolytické představitele bakterií jako *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus* (jednotky – počet buněk na g⁻¹ vzorku). Hustotu jsme stanovili u stejných vzorků, jako v případě předchozích analýz (jeleni, daňci, ovce a tuři). Analýza ukázala, že hustota celkových bakterií v bachoru jelenů dosahuje hodnot $2,14 \times 10^9 - 9,95 \times 10^{09}$, u daňků $2,23 \times 10^9 - 8,02 \times 10^9$, u ovcí $1,74 \times 10^9 - 1,95 \times 10^{10}$ a u turů $1,39 \times 10^9 - 8,14 \times 10^9$. V případě hustoty bakterie *Fibrobacter succinogenes* dosahovala v případě jelenů hodnot $1,37 \times 10^6 - 8,41 \times 10^7$, u daňků $2,00 \times 10^6 - 7,86 \times 10^7$, u ovcí $2,59 \times 10^2 - 6,46 \times 10^3$ a u turů $1,99 \times 10^6 - 3,63 \times 10^6$. Jako dalším druhem bakterie, u které jsme stanovovali hustotu je *Ruminococcus albus*, jehož hustota dosahuje v případě jelenů hodnot $9,46 \times 10^5 - 7,46 \times 10^6$, v případě daňků $1,67 \times 10^7 - 9,32 \times 10^7$, v případě ovcí $2,19 \times 10^6 - 6,50 \times 10^6$ a v případě turů $9,11 \times 10^6 - 9,96 \times 10^6$. Posledním druhem bakterie, u které jsme stanovili hustotu, je *Ruminococcus flavefaciens*, jehož hustota dosahuje hodnotu u jelenů $1,48 \times 10^5 - 3,12 \times 10^7$, u daňků $1,22 \times 10^6 - 5,92 \times 10^6$, u ovcí $1,05 \times 10^6 - 7,33 \times 10^6$ a u turů $3,38 \times 10^7 - 7,01 \times 10^7$. Na základě statistické analýzy (Mann Whitney test, $P < 0,05$) bylo prokázáno, že hustota bakterií druhu *Fibrobacter succinogenes* je signifikantně vyšší u jelenů a daňků než u ovcí a turů, a dále druh *Ruminococcus flavefaciens* je signifikantně vyšší u ovcí a turů než u jelenů a daňků, na hladině významnosti $P < 0,05$. U ostatních druhů bakterií nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými populacemi.

Tabulka 21: RT-PCR výsledky hustoty celkových bakterií, hlavních představitelů celulólytických bakterií, jako jsou *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* a *Ruminococcus albus* (jednotky - počet buněk g⁻¹)

Vzorek	Zvíře	Celkové bakterie	<i>F. succinogenes</i>	<i>R. albus</i>	<i>R. flavefaciens</i>
6	jelen	9,78 x 10 ⁹	5,47 x 10 ⁶	1,42 x 10 ⁶	8,59 x 10 ⁵
7	jelen	4,09 x 10 ⁹	1,37 x 10 ⁶	1,28 x 10 ⁶	2,20 x 10 ⁶
9	jelen	5,93 x 10 ⁹	6,97 x 10 ⁶	7,46 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁵
22	jelen	9,95 x 10 ⁸	8,70 x 10 ⁶	9,46 x 10 ⁵	1,48 x 10 ⁵
33	jelen	2,14 x 10 ⁹	1,38 x 10 ⁷	1,58 x 10 ⁶	1,85 x 10 ⁶
40	jelen	3,70 x 10 ⁹	8,41 x 10 ⁷	9,06 x 10 ⁶	3,12 x 10 ⁷
73	daněk	2,37 x 10 ⁹	1,13 x 10 ⁷	1,67 x 10 ⁷	5,92 x 10 ⁶
75	daněk	3,69 x 10 ⁹	2,76 x 10 ⁷	5,15 x 10 ⁷	4,11 x 10 ⁶
76	daněk	4,66 x 10 ⁹	2,00 x 10 ⁶	1,75 x 10 ⁷	1,22 x 10 ⁶
77	daněk	8,02 x 10 ⁹	2,50 x 10 ⁷	3,07 x 10 ⁷	3,22 x 10 ⁶
78	daněk	2,23 x 10 ⁹	7,86 x 10 ⁷	1,96 x 10 ⁷	1,37 x 10 ⁶
80	daněk	4,29 x 10 ⁹	3,00 x 10 ⁷	9,32 x 10 ⁷	2,69 x 10 ⁶
93	ovce	2,82 x 10 ⁹	6,46 x 10 ³	4,79 x 10 ⁶	2,57 x 10 ⁶
94	ovce	1,95 x 10 ¹⁰	8,87 x 10 ²	3,10 x 10 ⁶	7,33 x 10 ⁶
95	ovce	1,74 x 10 ⁹	1,35 x 10 ³	6,50 x 10 ⁶	2,60 x 10 ⁶
96	ovce	2,74 x 10 ⁹	2,59 x 10 ²	2,19 x 10 ⁶	1,05 x 10 ⁶
97	tur	8,14 x 10 ⁹	2,14 x 10 ⁶	1,20 x 10 ⁷	7,01 x 10 ⁷
98	tur	5,91 x 10 ⁹	1,99 x 10 ⁶	9,96 x 10 ⁷	5,54 x 10 ⁷
99	tur	1,95 x 10 ⁹	3,63 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁷	3,88 x 10 ⁷
100	tur	1,39 x 10 ⁹	2,76 x 10 ⁶	9,11 x 10 ⁶	3,97 x 10 ⁷

6.1.5.2. Shrnutí analýzy

Tato studie nám vytvořila celkový pohled na strukturu bakteriální populace v bacheru jelenů, daňků, ovcí a turů. Smyslem analýzy bylo popsat strukturu bakteriálních populací jednotlivých druhů zvířat a porovnat ji mezi jednotlivými skupinami zvířat. Analýza byla provedena pomocí metody sekvenování nové generace a dále molekulárně genetickou metodou qPCR real-time, již jsme kvantifikovali stěžejní celulólytické druhy bakterií osidlující bacheru.

Byla provedena analýza alfa a beta diverzity jednotlivých bakteriálních společenstvem v jednotlivých vzorcích, která nám vypověděla o diverzitě jednotlivých bakteriálních populací v porovnání mezi skupinami druhů zvířat. V obou případech, zmíněných indexů se došlo k závěru, že bakteriální komunity vyskytující se v bacheru mají podobnou strukturu, ale relativní podíl zjištěných bakterií se mezi jednotlivými skupinami zvířat odlišuje. Vysoké hodnoty Shannonova indexu naznačující vysokou druhovou diverzitu bakterií ve vzorcích s vysokou podobností druhů, což nám potvrzuje vysoká hodnota Simpsonova indexu. Tento závěr nám potvrdila i analýza PCoA. Vysoký počet pozorovaných taxonomických jednotek

OTUS naznačuje vysoké zastoupení testovaných bakteriálních druhů ve vzorcích. Rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých druhů bakterií mezi jednotlivými skupinami zvířat jsou výsledkem strategií ve využívání krmiv přežvýkavců (Henderson et al., 2013).

Výsledky ukázaly, že více jak 89 % sekvencí bylo přiřazeno bakteriálním kmenům *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, což bylo zjištěno i v dalších studiích zabývajících se trávicím traktem přežvýkavců jak volně žijících, tak hospodářských (Sundset et al., 2007; Kong et al., 2010; Samsudin et al., 2014; Grüninger et al., 2014; Zielinska et al., 2016; Hu et al., 2017; Qian et al., 2017). Tyto bakteriální druhy se vyskytují a jsou dominantní i u ostatních suchozemských obratlovců, kde mají také funkční význam v trávicím traktu (Shanks et al., 2011; Li et al., 2016).

Analýza bakteriálních komunit u jelenů, daňků, ovcí a turů přinesla výsledky, ze kterých je patrné, že jeleni měli zastoupení kmene *Firmicutes* 43,5 %, daňci 51,1 %, ovce 55,0 % a tuři 55,4 %. Zastoupení kmene *Bacteroidetes* mají jeleni 46,8 %, daňci 39,4 %, ovce 33,2 % a tuři 35,1 %. Zajímavostí je, že téměř polovina sekvencí bylo přiřazeno bakteriím, které jsou nekultivované. Tento fakt byl potvrzen i v jiných studiích přežvýkavců (Sundset et al., 2009; Clauss et al., 2009; Kong et al., 2010; Grüninger et al., 2014; Li et al., 2014; Hu et al., 2017) Jednalo se o 46,4 % všech sekvencí. Sekvence nekultivovaných bakterií jsou ve všech případech ve větším zastoupení u volně žijících přežvýkavců než u domácích. Tyto sekvence byly přiřazeny nekultivovaným bakteriím řádu *Bacteroidales*, *Bacteroidales* BS11, *Clostridiales*, nekultivovaným bakteriím čeledi *Coriobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*. Největší zastoupení nekultivovaných bakterií měl řád *Clostridiales*, nejmenší *Coriobacteriaceae*. Variabilita procentuálního zastoupení sekvencí mezi jednotlivými skupinami zvířat bez ohledu na statistickou významnost byla prokázána u nekultivovaných bakterií řádu *Bacteroidales*, nekultivovaných bakterií čeledi S24-7, řádu *Bacteroidales*, rodu *Ruminococcus* rodu *Succinivibrio* a rodu *Butyrivibrio*.

Řada studií zaměřených na studium bakteriálních komunit v bacheru divokých přežvýkavců uvádí, že dominantními kmeny v trávicím traktu jsou *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, které pokryjí více jak 90 % celkových sekvencí bakterií (Sundset et al., 2007; Grüninger et al., 2014; Li et al., 2015; Zielinska et al., 2016; Hu et al., 2017; Qian et al., 2017). Stejná hypotéza platí i hospodářských přežvýkavců (Kong et al., 2010; Kittelmann et al., 2014). Tyto s výsledky naší studie. Dalším aspektem je fakt, že téměř polovina (46,1 %) získaných sekvencí bakterií byla přiřazena nekultivovaným druhům bakterií. Stejný jev byl pozorován také u volně žijících přežvýkavců i hospodářských přežvýkavců.

Když budeme konfrontovat naše výsledky se studii, které byly prováděny na jak volně žijících přežvýkavcích, tak na hospodářských přežvýkavcích, tak dojdeme k závěru, že struktura bakteriálních populací jednotlivých druhů zvířat je velice podobná. Tyto populace se mezi jednotlivými druhy zvířat odlišují pouze podle výše zastoupení jednotlivých druhů bakterií. Zaměříme-li se na volně žijící přežvýkavce, z našich výsledků vyplývá, že jeleni mají větší zastoupení kmene *Bacteroidetes* než kmene *Firmicutes*, což je v rozporu se studii zaměřenými na volně žijící přežvýkavce (Sundset et al., 2007; Grunniger et al., 2014; Li et al., 2015; Zielinska et al., 2016; Hu et al., 2017; Qian et al., 2017). Tento jev je spíše pozorován u hospodářských přežvýkavců s výrazně odlišnou dietou, kde je větší zastoupení kmene *Bacteroidetes* než *Firmicutes* (Hess et al., 2011; Raphael Barbeta de Jesus et al., 2015). Tento jev je možné vysvětlit tím, že vzorky podrobené analýze byly z části odebrané z oborního chovu a zimního období, kde je dieta částečně ovlivněna člověkem, což koresponduje se závěry Hendersona et al. (2013). Zvěř je v této roční době hojně přikrmována jadrnými a silážními krmivy. Co se týče zastoupení bakteriálních kmenů u daňka, ovce a turů v této studii, všechny tyto druhy mají větší zastoupení kmene *Firmicutes* než *Bacteroidetes*, u daňků je tento fakt v souladu s dostupnou literaturou, ale v případě ovcí a turů je popisován opačný stav (Sundset et al., 2007; Hess et al., 2011; Grunniger et al., 2014; Li et al., 2015; Raphael Barbeta de Jesus et al., 2015; Zielinska et al., 2016; Hu et al., 2017; Qian et al., 2017). Tento jev lze vysvětlit tím, že tuři i ovce byly chovány ve volném prostředí pastvy, kde dieta nebyla tak rozsáhle ovlivněna člověkem. Obecně kmen *Firmicutes* dominuje u zvířat konzumujících velké množství celulosy, zástupci tohoto kmene degradují rostlinná vlákna pomocí celulolytické složky mikroorganismům. Do těchto zvířat se řadí především volně žijící přežvýkavci, zatímco zástupci kmene *Bacteroidetes* především degradují sacharidy a bílkoviny (Fernando et al., 2010; Jami et al., 2014; Waite and Taylor, 2014; Nuriel-O et al., 2016). Výše zmíněné závěry potvrzuje i studie, která byla prováděna u kabarů (Hu et al., 2017), kdy zastoupení kmene *Bacteroidetes* byly hojnější v případě krmení letní dietou s vysokým obsahem škrobu, bílkovin a laktátu (Zebeli et al., 2008; Belanche et al., 2012), zatímco v zimních dietách s předkládanou dietou s vysokým obsahem hrubé vlákniny bylo vyšší zastoupení kmene *Firmicutes* (Fernando et al., 2010). Z výše uvedeného docházíme k závěru, že rozdíly složení bakteriální populace a zastoupení jednotlivých druhů bakterií je závislé na složce potravy (Bergvall, 2009; Henderson et al., 2013). Mikrobiom v bachoru, jeho funkce, složení a interakce mezi jednotlivými druhy mikroorganismů tedy závisí především na složení krmné dávky, ale také např. na podávání antibiotik nebo odčervovacích prostředků (Russell et al., 2001; Sullivan et al., 2001; Dethlefsen et al., 2008).

Součástí této studie je detekci a porovnání četnosti hlavních představitelů zástupců celololytických bakterií, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*. Tato část byla provedena kvantifikací hlavních představitelů celololytických druhů pomocí metody qPCR specifickými primery cílenými pouze na tyto druhy bakterií. Z výsledků vyplývá, že signifikantní rozdíly mezi jednotlivými druhy zvířat byly pozorovány u bakterie *Fibrobacter succinogenes* u jelenů a daňků, a u *Ruminococcus flavefaciens* u ovcí a turů, kde byly výrazně vyšší počty těchto bakterií s porovnáním s ostatními druhy zvířat na hladině významnosti ($P < 0,05$). Počty jednotlivých druhů bakterií korespondovaly s poznatkami uváděnými v literárních zdrojích (Koike and Kobayashi, 2001).

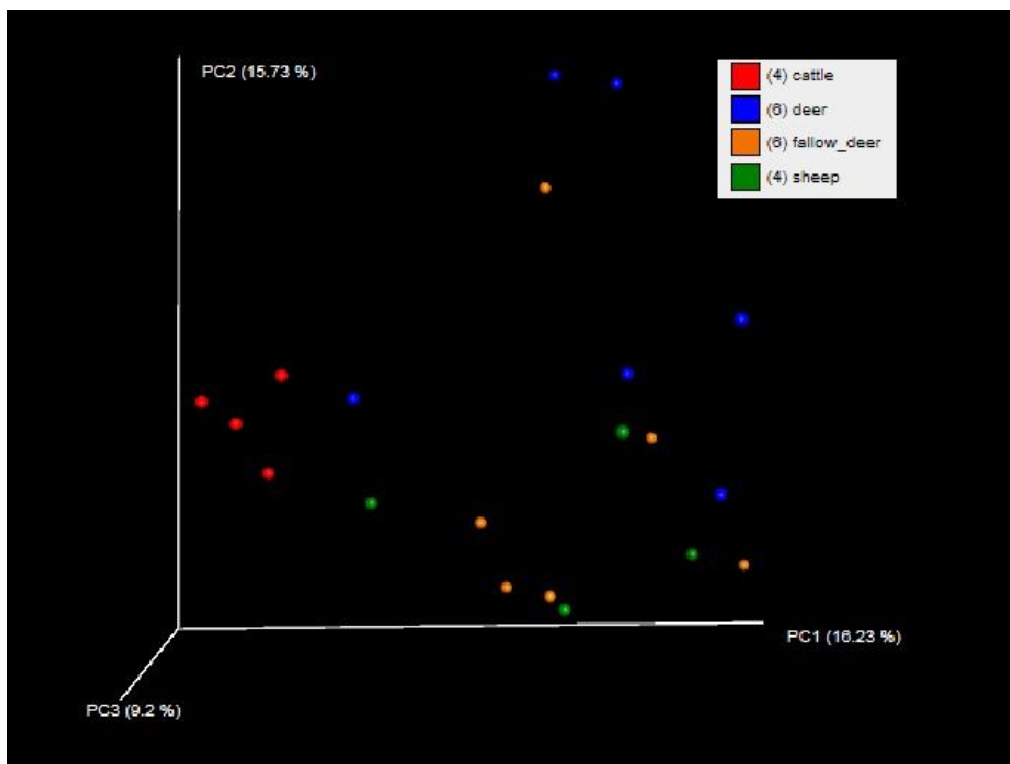
6.1.6. Molekulárně genetický screening hub v bachoru přežvýkavců pomocí NGS

Cílem této analýzy bylo popsat složení a diverzitu anerobních hub vyskytující se v bachoru volně žijících přežvýkavců, konkrétně jelena evropského a daňka skvrnitého v konfrontaci s domácími přežvýkavci, konkrétně tura domácího a ovce žijícím na území České republiky. Dále jsme zkoumali odlišnosti ve složení společenstev hub mezi jednotlivými druhy zvířat i v rámci jednotlivých zvířat stejného druhu. Odebráno bylo 20 vzorků obsahů bachoru, přesněji z bachoru jelenů ($n=6$), daňků ($n=6$), turů ($n=4$) a ovcí ($n=4$). Vzorky byly podrobeny pyrosekvenování, které bylo provedeno v regionu ITS1. Sekvence byly zpracovány a analyzovány pomocí softwaru QIIME 1.9.0. Zjištěné chyby při sekvenování byly odstraněny pomocí naprogramování softwaru. Po odstranění chyb bylo celkově načteno 112371 sekvencí s průměrem 5618 sekvencí pro každý vzorek, v rozmezí od 489 do 27702. Komunitní rozmanitost u jednotlivých vzorků byla měřena u jelenů, daňků, turů a ovcí pomocí Shannonova indexu, inverzního Simpsonova indexu, Chao1 indexu, richness indexu a indexu evenness. Shannonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 8,43 – 10,22, mezi daňky 9,17 – 11,12, mezi ovce 8,97 – 11,15 a u turů 8,30 – 10,82. Simpsonův index dosahoval mezi jednotlivými jeleny hodnoty 0,99 – 1,00, mezi daňky 0,99 – 1,00 (tabulka 22). Oba indexy ukázaly, že komunitní rozmanitost se mezi jednotlivými jeleny, daňky, ovce a tury ani v porovnání mezi jednotlivými skupinami zvířat neliší (Mann Whitney test, $P < 0,05$). Dále byly měřeny index bohatosti (Richness) a index rovnoměrnosti (Evenness). Richness index dosahoval hodnot u jelenů 97,0 – 99,0, u daňků 91,0 – 98,0, u ovcí 92,0 – 0,99 a u turů 0,95 – 0,99. Evenness index dosahoval hodnot u jelenů 0,83 – 0,95, u daňků 0,77 – 0,90, u ovcí 0,85 – 0,93 a u turů 0,89 – 0,91 (Tabulka č. 22). Oba indexy ukázaly, že komunitní rozmanitost se mezi jednotlivými jeleny, daňky, ovce a tury neliší (Mann Whitney test, $P < 0,05$) a neliší se ani v porovnání mezi skupinami zvířat.

Tabulka 22: Indexy alfa diverzity jednotlivých vzorků zvířat odebraných z bachoru

Vzorek	Zvíře	Observed OTU	Indexy diverzity				
			Shannon	Simpson	Chao1	Evennes	Richness
6	jelen	475	4,78	0,84	553,60	0,97	0,54
7	jelen	958	6,30	0,95	1077,04	0,95	0,64
9	jelen	421	3,92	0,80	517,46	0,98	0,45
26	jelen	325	4,68	0,84	442,05	0,98	0,56
37	jelen	194	5,08	0,91	307,14	0,98	0,67
49	jelen	214	4,13	0,81	281,69	0,99	0,53
73	daněk	211	5,15	0,92	316,39	0,98	0,67
75	daněk	331	6,13	0,96	478,00	0,97	0,73
76	daněk	448	5,10	0,88	594,39	0,97	0,58
77	daněk	304	5,80	0,93	477,08	0,97	0,70
78	daněk	246	4,11	0,86	310,20	0,99	0,52
80	daněk	260	6,48	0,97	371,25	0,96	0,81
93	ovce	548	6,90	0,98	668,87	0,95	0,76
94	ovce	173	3,66	0,74	228,31	0,99	0,49
95	ovce	84	4,66	0,91	133,40	0,99	0,73
96	ovce	354	6,77	0,98	463,38	0,96	0,80
97	kráva	113	4,40	0,84	167,05	0,99	0,64
98	kráva	249	5,58	0,94	342,00	0,98	0,70
99	kráva	210	5,21	0,93	316,61	0,98	0,68
100	kráva	601	5,57	0,95	656,05	0,98	0,60

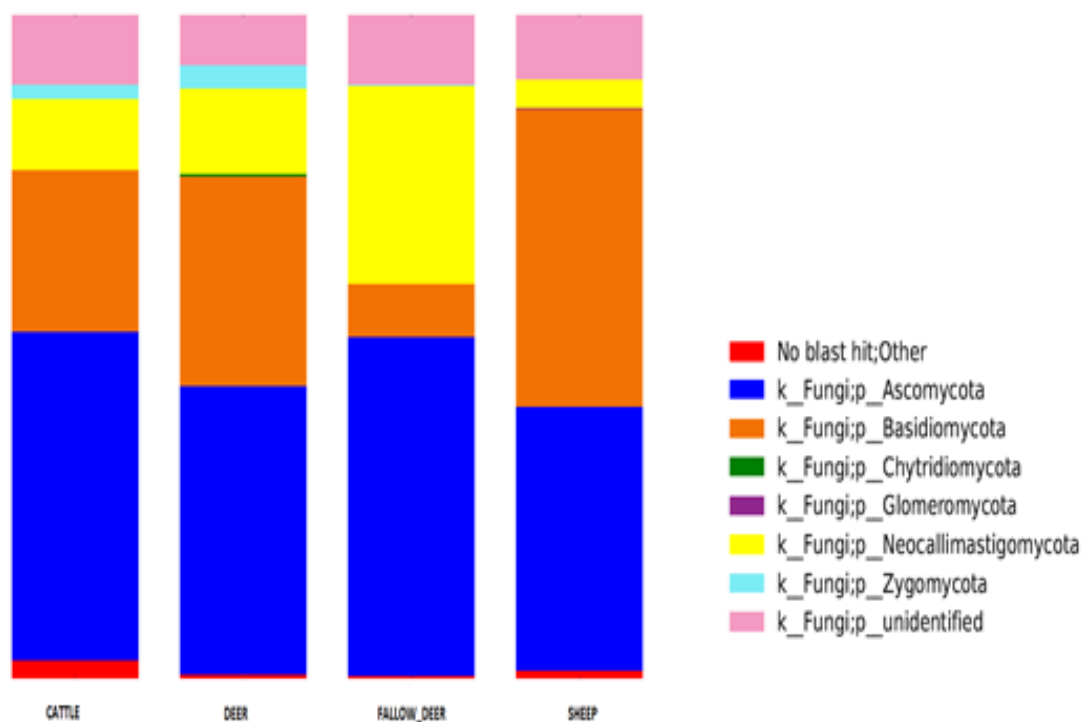
Po porovnání alfa diverzity mezi jednotlivými zvířaty a skupinami zvířat jsme dále zkoumali beta diverzitu mezi jednotlivými skupinami. Porovnávali jsme diverzitu hub mezi jednotlivými skupinami zvířat. Ve skupině jelenů, daňků, ovcí a turů a mezi skupinami navzájem. Nejprve jsme počítali na základě shlukování vzorků Bray-Curtisův index a zakomponovali do analýzy principal coordinate analysis (PCoA) jsme vizualizovali vzdálenosti mezi jednotlivými zvířaty (obrázek 29). Analýza prokázala, že vzorky jednotlivých skupin živočichů se shlukují kolem sebe na ose y, ale jsou rozptýleny po ose x. To znamená, že jednotlivé skupiny zvířat mají podobné zastoupení druhů jednotlivých hub, ale jiné odlišné procentuální zastoupení.



Obrázek 29: Principal coordinate analysis (analýza PCoA) na základě příslušnosti jednotlivých vzorků v komunitách hub na základě Bray-Curtisova indexu. Modré tečky představují jeleny, oranžové představují daňky, červené představují tury a zelené představují ovce. Vzdálenosti mezi tečkami na ploše představuje relativní odlišnosti v komunitní příslušnosti jednotlivých vzorků

Struktura populace hub v bachoru

Taxonomická analýza vzorků odebraných z bachoru ukázala, že bachorová populace hub se skládá celkově z 6 kmenů, 27 tříd, 68 řádů, 136 čeledí a 251 rodů (obrázek 30). Z celkového počtu sekvencí bylo 46,1 % přiřazeno kmenu *Ascomycota*. Dalším nejhojnějším kmenem byl kmen *Basidiomycota* 27,3 %, kmen *Neocallimastigomycota* 14,5 % a kmen *Zygomycota* 1,5 %. Ostatní kmeny hub *Chytridiomycota*, *Glomeromycota* byly zastoupeny v téměř nulových hodnotách. Co se týká porovnání jednotlivých detekovaných sekvencí hub mezi jednotlivými skupinami zvířat, tak kmen *Ascomycota* je nejvíce zastoupený u daňků 51,2 %, nejméně u ovcí 39,8 %, u jelenů 43,6 % a u turů 49,6 %. Kmen *Basidiomycota* měl největší zastoupení sekvencí u ovcí 45,1 %, nejmenší u daňků 7,9 %, u turů 24,4 % a jelenů 31,7 %. Kmen *Neocallimastigomycota* má největší zastoupení sekvencí u daňků 29,9 %, nejmenší u ovcí 4,3 %, u turů 10,7 % a jelenů 13,0 %. Posledním kmenem, který má významné zastoupení je kmen *Zygomycota*, který má největší zastoupení sekvencí u jelenů 3,5 %, nejmenší u ovcí 0,1 %, turů 2,3 % a daňků 0,2 %.

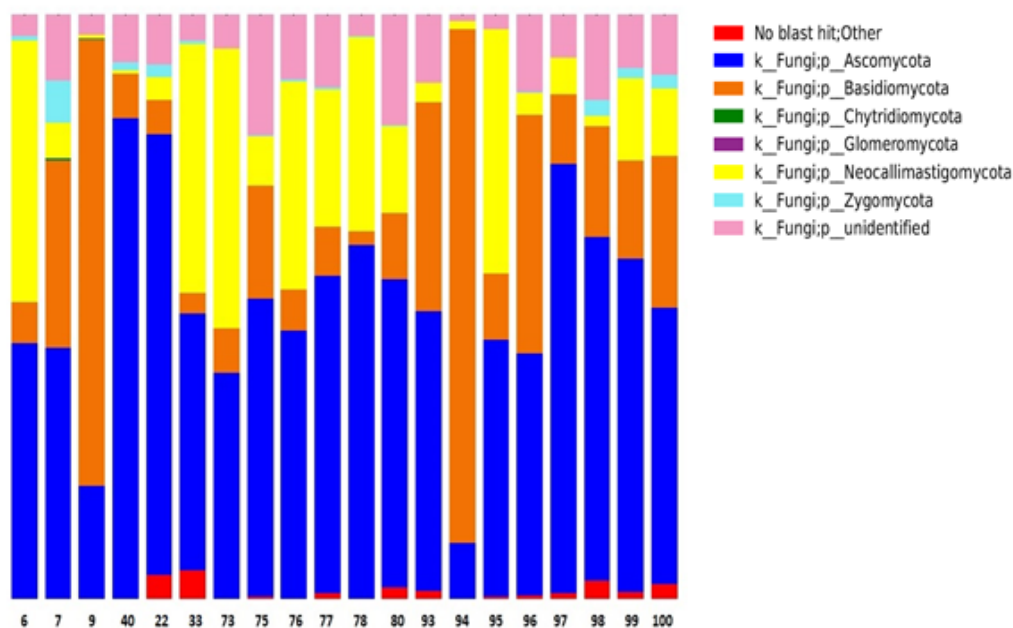


Obrázek 30: Struktura populace hub na bázi kmenů jednotlivých skupin zvířat. Sloupce vyjadřují procentuální zastoupení sekvencí přiřazených ke kmenům bakterií, které jsou uvedeny v legendě

Porovnání výskytu hub mezi jednotlivými druhy zvířat

Druhy, které se vyskytují u všech přežvýkavců, jsou rod *Archaeorhizomyces*, rod *Epicoccum*, rod *Penicillium*, rod *Galactomyces*, rod *Pichia*, neidentifikované houby třídy *Saccharomacetes*, neidentifikované houby kmene *Ascomycota*, rod *Gymnopilus*, rod *Inocybe*, rod *Pholiota*, rod *Stropharia*, neidentifikované houby kmene *Basidiomycot* a rod *Orpinomyces*.

Dále budeme popisovat jednotlivé počty sekvencí mezi skupinami zvířat, tudíž mezi jeleny, daňky, tury a ovce (obrázek 31).



Obrázek 31: Diverzita jednotlivých druhů hub ve zkoumaných vzorcích

Rodem hub s největším zastoupením je rod *Orpinomyces*, který má největší zastoupení u daňků 29,9 %, nejmenší zastoupení u ovcí 4,3 %, u jelenů 13,0 % a u turů 10,7%. Rod *Pichia* má největší zastoupení u turů 11,2 %, nejmenší u jelenů, u ovcí 10,2 % a u daňků 5,8 %. Rod *Epicoccum* má největší zastoupení u jelenů 10,3 %, u daňků 9,3 %, u ovcí 2,2 % a u turů má nulové zastoupení. Rod *Penicillium* má největší zastoupení u daňků 9,7 %, nejmenší u ovcí 0,3 %, u turů 3,8 % a u jelenů 2,2 %. Neidentifikované houby kmene *Ascomycota* mají největší zastoupení u daňků 4,3 %, nejmenší u turů 2,0 %, u jelenů 4,2 % a u ovcí 3,8 %. Rod *Archaeorhizomyces* má největší zastoupení u ovcí 10,2 %, nejmenší zastoupení u jelenů a turů, u daňků 3,3 %. Rod *Gymnopilus* má největší zastoupení u jelenů 13,9 %, a nejmenší u turů 0,0 %, u daňků a ovcí 0,1 %. Rod *Inocybe* má největší zastoupení u turů 11,4 %, nejmenší u jelenů 0,5 %, u daňků 1,5 % a u ovcí 0,8 %. Rod *Stropharia* má největší zastoupení u ovcí 11,9 %, u turů je nulové zastoupení, u jelenů 0,3 % a u daňků 0,2 %. Rod *Pholiota* má největší zastoupení u jelenů 6,2 %, nejmenší u turů 0,1 %, u ovcí 4,7 % a u daňků 0,4 %. Rod *Galactomyces* má největší zastoupení u turů 9,3 %, nejmenší u daňků 0,3 %, u jelenů 1,7 % a u ovcí 0,7 %. Posledním zástupce jsou neidentifikované houby třídy *Saccharomycetes*, která má největší zastoupení u jelenů 4,2 %, nejmenší u ovcí 1,9 %, u daňků 2,6 % a u turů 2,1 %. Zajímavým poznatkem této analýzy je fakt, že největší zastoupení má anaerobní druh *Orpinomyces* s výrazným fibrolitickým potenciálem. Dále je zajímavé, že 21 % z celkových sekvencí hub je určeno neidentifikované.

Tato studie poskytla poznání struktury hub vyskytující se v bachorech jak volně žijících přežvýkavců, tak přežvýkavců domácích. Z výsledků vyplývá, že struktura hub v bachorovém prostředí má podobnou strukturu, ale odlišné relativní podíly jednotlivých druhů. Tento závěr je potvrzen i indexy alfa a beta diverzity jednotlivých skupin zvířat i zvířat samotných. Vysoké hodnoty Shannonova indexu naznačují vysokou počet druhů v jednotlivých vzorcích se značnou podobností, což potvrzuje Simpsonův index. Tato tvrzení podporuje i analýza PCoA. Z výsledků vyplývá, že jsme objevili značné rozdíly v relativním podílu jednotlivých druhů hub mezi přežvýkavci. Druhá rozmanitost a počty jednotlivých druhů jsou v závislosti na struktuře diety.

Z našeho hlediska, protože tato práce je převážně zaměřena na strukturu mikroorganismů štěpící celulosu, je nejzajímavější poznání zastoupení anaerobních hub rodu *Orpinomyces*. Podíl z celkového počtu sekvencí je 14,5 %. Největší zastoupení má u daňky, kde zaujímá 29,9 % z celkových sekvencí, dále druhé největší zastoupení je u jelenů 13,0 %, u turů 10,7 % a u ovcí 4,3 %. V dostupné literatuře se uvádí, že zatím bylo z bachoru izolováno a popsáno více než 16 druhů anaerobních hub rozdělených do 6 rodů: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces* a *Cyllamyces* (Ozkose et al., 2001). Bachorové houby se aktivně účastní trávení vlákniny a rozrušením rostlinných pletiv umožňují pronikání bakterií do míst pro ně původně nedostupných. Jejich úloha při trávení krmiva bohatého na vlákninu je vzhledem k jejich vysoké celulolytické, hemicelulolytické a xylanolytické aktivitě nesporná (Novotná et al., 2010). Podíl na celkové bachorové fermentaci se však dosud nepodařilo zcela přesně kvantifikovat (Teunissen et al., 1993). Byla prokázána existence konsorcií mezi anaerobními houbami a bachorovými houbami při trávení hrubé vlákniny (Shirohi et al., 2012). Houby napomáhají rozrušovat rostlinná pleva a tím pomáhají celulolytickým bakteriím k přístupu k celulóze a následnému štěpení. Z našich výsledků vyplývá, že rod *Orpinomyces*, který byl identifikován u všech skupin zvířat v naší analýze, se podílí na štěpení celulosy a vyskytuje se u volně žijících i domácích přežvýkavců (Nagpal et al., 2011; Kittelmann et al., 2012). Vysokou variabilitu v zastoupení tohoto druhu 29,9 % u daňky, 4,3 % u ovcí, 10,7 % u turů a u jelenů 13,0 % lze spojovat se složením celkové potravy a prostředí, ve kterém zvířata žijí.

6.1.7. Biochemická aktivita extracelulárních enzymů bachorových obsahů

V této analýze jsme porovnali všech 20 vzorků, které jsme analyzovali v předchozí analýze, tudíž jeleny, daňky, ovce a tury. Porovnávali jsme celulólytickou a xylanolytickou aktivitu mezi jednotlivými skupinami zvířat. Cílem bylo porovnat

extracelulární aktivitu prostředí v bachoru volně žijících přežvýkavců s domácími (tabulka 23). Z výsledků vyplývá, že enzymová aktivita celulas, celobiohydrolas, beta-glukosidas a xylanasy je signifikantně vyšší na hladině významnosti (ANOVA, $P < 0,05$) než u volně žijících přežvýkavců.

Tabulka 23: Porovnání enzymové aktivity mezi volně žijícími a domácími přežvýkavci

Označení vzorků	Zvíře	Aktivita enzymů (ug/ml/h/1mg proteinu)			
		Celulasy	Xylanasy	Celobiohydrolasy	β -glukosidasy
6	jelen	0,31	1,07	0,46	0,48
7	jelen	0,40	1,41	0,60	0,73
9	jelen	0,34	1,27	0,54	0,55
40	jelen	0,53	1,86	0,75	0,91
41	jelen	0,39	1,03	0,51	0,66
22	jelen	0,50	1,73	0,58	0,62
33	jelen	0,42	1,59	0,83	0,87
73	daněk	0,64	3,08	1,11	1,11
75	daněk	0,45	1,13	0,76	0,75
76	daněk	0,51	1,63	0,64	0,81
77	daněk	0,48	1,41	0,67	0,84
80	daněk	0,43	1,51	0,71	0,73
93	ovce	0,17	0,33	0,28	0,28
94	ovce	0,21	0,58	0,33	0,35
95	ovce	0,16	0,53	0,18	0,26
96	ovce	0,20	0,62	0,33	0,37
97	kráva	0,21	0,48	0,32	0,29
98	kráva	0,10	0,49	0,26	0,17
99	kráva	0,29	0,92	0,12	0,40
100	kráva	0,16	0,45	0,27	0,27

6.2. Izolace čistých bakteriálních kultur a ověření jejich biochemické celulytické aktivity

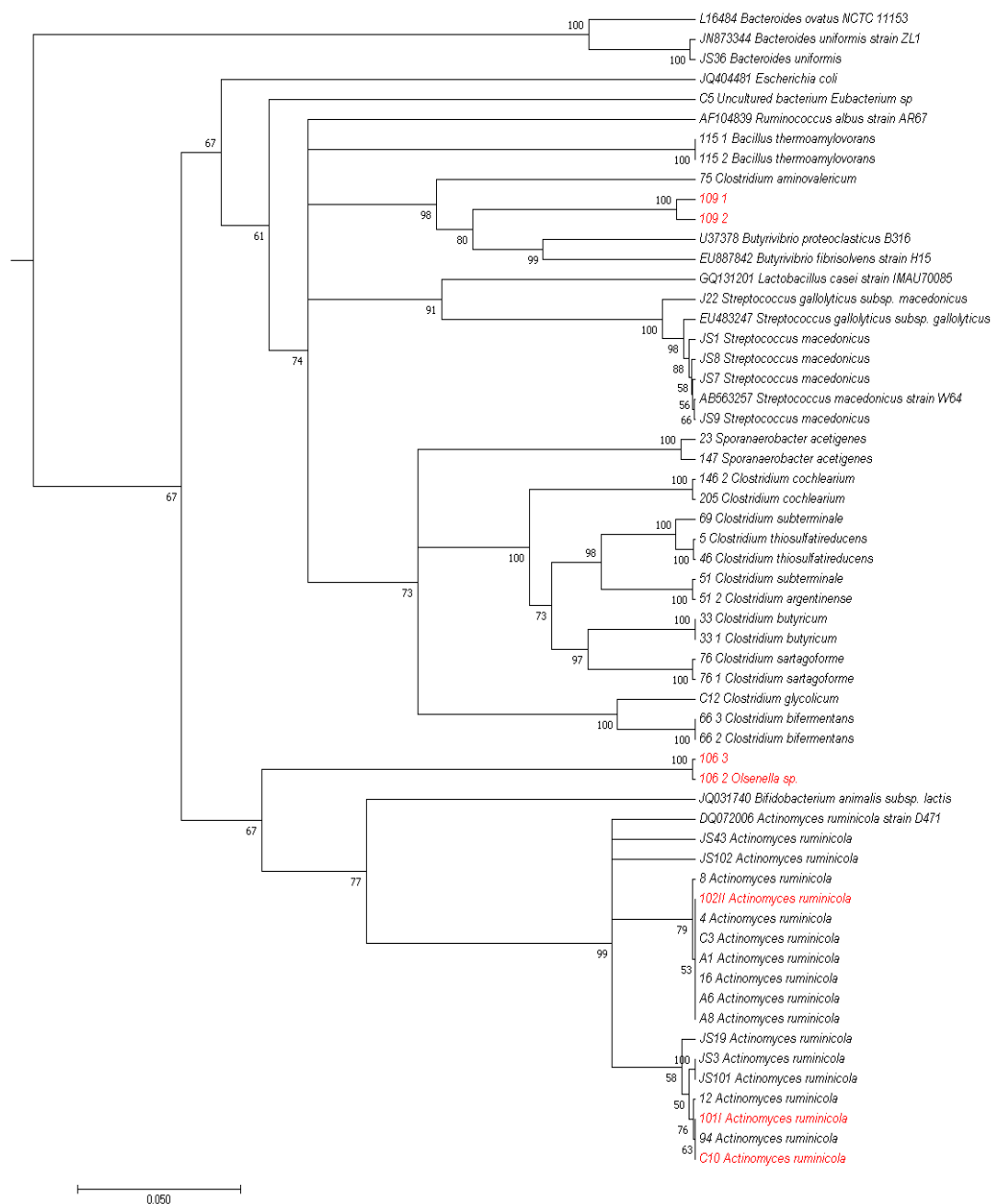
Dalším krokem naší práce byla izolace čistých bakteriálních kultur z bachorových obsahů jelenů evropských s celulytickou aktivitou. Izolace byly prováděny za anaerobních podmínek v rukavicovém boxu s anaerobní atmosférou a metodou ROLL-TUBE na agarových živných půdách M10 s různými substráty (celobiosa, karboxymethylcelulosa, glukosa, filtrační papír Whatman a xylan), agarových živných půdách medium Celulose for *Ruminococcus* a na agarových živných půdách modifikovaného PYG media. Po 24 – 48 (120) hodinové kultivaci se narostlé kolonie přeočkovaly do tekutého média M10 s daným

substrátem, Celulose for *Ruminococcus* a modifikované PYG. Po nárůstu budou z izolátů připraveny stěry a obarveny metodou podle Grama (Ogimoto and Imai, 1981). Dále jsme izolované čisté kultury testovali z hlediska biochemických aktivit při štěpení různých typů celulosy (tabulka 24). Kultury byly testovány na aktivity CM-celulasy, endoglukanasy a celobiohydrolasy (tabulka 25). Po ověření biochemické aktivity byly čisté bakteriální kultury vykazující požadovanou celulolitickou aktivitu nakultivovány a identifikovány pomocí 16S r DNA. Dále byla z čistých kultury s celulolytickou aktivitou vyizolována DNA, která byla amplifikována, předčištěna a sekvenován její aplikon. Výsledná konsenzní sekvence byla porovnána s internetovou databází GenBank NCBI se sekvencemi příbuzných druhů v softwaru BLAST. V tabulce 24 jsou uvedeny všechny čisté kmeny bakterií, které byly za celou práci izolovány. Dále podle výsledných sekvencí jednotlivých bakterií byl sestrojen fylogenetický stromek, který nám vyjadřuje příbuznosti jednotlivých izolovaných kmenů (obrázek 32).

Tabulka 24: Seznam izolovaných čistých kmenů s celulolytickou aktivitou. V prvním sloupci je označení kmene, ve druhém sloupci je identifikovaný druh podle databáze NCBI, ve třetím podobnost izolátu s databází, ve čtvrtém sloupci je označeno na jakém médiu byla bakterie izolována a na jakém substrátu (RM = medium Celulose for *Ruminococcus*, CB – celobiosa, WT – celulosa – Whatmann, XY – xylan)

Kmen	Druh bakterie	Similarity (%)	Izolováno		Poznámka
			Medium	Substrát	
1	<i>Streptococcus macedonicus</i>	99,00	M10	CB	
7	<i>Streptococcus macedonicus</i>	100,00	M10	CB	
8	<i>Streptococcus macedonicus</i>	99,00	M10	CB	
9	<i>Streptococcus macedonicus</i>	99,00	M10	CB	
36	<i>Bacteroides uniformis</i>	99,00	M10	CB	
3	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	M10	CB	
19	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	M10	CB	
43	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	M10	CB	
101	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	M10	CB	
102	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	M10	CB	
C5	<i>Uncultured Eubacterium sp.</i>	99,00	M10	WT	
C12	<i>Clostridium glycolicum</i>	99,00	PYG	WT	
33	<i>Clostridium butyricum</i>	99,00	M10	WT	
51	<i>Clostridium subterminale</i>	99,00	M10	XY	
76	<i>Clostridium sartagoforme</i>	99,00	M10	XY	
94	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	M10	WT	
51 II	<i>Clostridium subterminale</i>	98,00	M10	WT	

C10	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	PYG	WT	nový druh
A6	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	PYG	WT	
75	<i>Clostridium aminovalericum</i>	99,00	M10	XY	
33 I	<i>Clostridium butyricum</i>	100,00	M10	XY	
66 III	<i>Clostridium bifermentans</i>	99,00	M10	XY	
A8	<i>Actinomyces ruminicola</i>	97,00	PYG	WT	nový druh
16	<i>Actinomyces ruminicola</i>	97,00	PYG	WT	nový druh
A1	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	PYG	WT	
12	<i>Actinomyces ruminicola</i>	98,00	PYG	CB	
66 II	<i>Clostridium bifermentans</i>	100,00	RM	XY	
C3	<i>Actinomyces ruminicola</i>	97,00	M10	WT	nový druh
76 I	<i>Clostridium sartagoforme</i>	99,00	RM	XY	
4	<i>Actinomyces ruminicola</i>	97,00	M10	CT	
J8	<i>Actinomyces ruminicola</i>	97,00	PYG	WT	nový druh
5	<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	100,00	M10	XY	
46	<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	99,00	M10	WT	
115I	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	99,00	RM	WT	
115II	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	99,00	RM	XY	
109 I	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	89,43	RM	XY	nový druh
106 III	<i>Olsenella uli</i>	95,75	RM	XY	nový druh
23	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	100,00	M10	XY	
147	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	99,00	RM	WT	
109 II	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	89,45	RM	WT	nový druh
106 II	<i>Olsenella uli</i>	96,33	RM	WT	nový druh
146 II	<i>Clostridium cochlearium</i>	100,00	RM	WT	
205	<i>Clostridium cochlearium</i>	100,00	RM	WT	
69	<i>Clostridium subterminale</i>	99,00	PYG	XY	
J22	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	99,00	M10	CB	
101I	<i>A. glycerinitolerans</i>	98,00	M10	CB	nový druh
102II	<i>A. glycerinitolerans</i>	98,00	M10	CB	nový druh



Obrázek 32: Fylogenetický stromek všech izolovaných bakterií. Jednotlivé větve určují vzdálenosti příbuznosti jednotlivých kmenů mezi sebou. Červeně zvýrazněné kmeny jsou bakterie, které byly označeny jako nové druhy bakterií

Tabulka 25: Enzymové aktivity jednotlivých izolovaných kmenů (CEL – celulosy, XY – xylanasy, CBH – celobiohydrolasy, β -GL – betaglukosidasy)

Kmen	Druh bakterie	Medium	Substrát	Aktivita enzymů (ug/ml/h/1mg proteinu)			
				CEL	XY	CBH	β -GL
1	<i>Streptococcus macedonicus</i>	M10	CB	12,22	26,75	1,32	4,52
7	<i>Streptococcus macedonicus</i>	M10	CB	6,43	8,54	1,2	1,5
8	<i>Streptococcus macedonicus</i>	M10	CB	8,32	10,25	1,02	3,25

9	<i>Streptococcus macedonicus</i>	M10	CB	4,52	4,65	0,96	1,25
36	<i>Bacteroides uniformis</i>	M10	CB	7,25	11,25	1,12	2,11
3	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	CB	5,65	4,56	2,54	2,32
19	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	CB	8,38	5,4	1,62	2,52
43	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	CB	16,25	11,39	1,12	10,85
101	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	CB	23,08	14,9	1,06	14,65
102	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	CB	6,37	10,71	0,96	2,35
C5	<i>Uncultured Eubacterium sp.</i>	M10	WT	18,25	26,54	1,25	3,25
C12	<i>Clostridium glycolicum</i>	PYG	WT	31,14	14,25	2,25	4,25
33	<i>Clostridium butylicum</i>	M10	WT	4,94	30,63	1,23	2,32
51	<i>Clostridium subterminale</i>	M10	XY	10,41	13,42	2,35	5,85
76	<i>Clostridium sartagoforme</i>	M10	XY	24,58	21,78	3,52	2,52
94	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	WT	3,18	2,52	0,23	1,23
51 II	<i>Clostridium subterminale</i>	M10	WT	10,41	13,34	2,25	5,21
C10	<i>Actinomyces ruminicola</i>	PYG	WT	19,96	14,94	2,12	1,75
A6	<i>Actinomyces ruminicola</i>	PYG	WT	13,65	7,51	0,89	4,21
75	<i>Clostridium aminovalericum</i>	M10	XY	10,04	6,375	1,21	3,25
33 I	<i>Clostridium butyricum</i>	M10	XY	28,61	15,02	0,98	2,25
66 III	<i>Clostridium bif fermentans</i>	M10	XY	8,35	15,69	1,23	2,21
A8	<i>Actinomyces ruminicola</i>	PYG	WT	16,06	14,93	1,65	5,65
16	<i>Actinomyces ruminicola</i>	PYG	WT	23,02	24,89	2,32	1,25
A1	<i>Actinomyces ruminicola</i>	PYG	WT	26,2	22,19	1,58	3,66
12	<i>Actinomyces ruminicola</i>	PYG	CB	10,86	18,56	2,52	1,65
66 II	<i>Clostridium bif fermentans</i>	RM	XY	8,25	8,32	1,21	2,54
C3	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	WT	17,25	27,42	3,56	4,56
76 I	<i>Clostridium sartagoforme</i>	RM	XY	24,54	21,88	3,52	5,58
4	<i>Actinomyces ruminicola</i>	M10	CT	7,86	3,54	1,5	1,21
J8	<i>Actinomyces ruminicola</i>	PYG	WT	14,37	10,71	1,65	5,65
5	<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	M10	XY	26,98	15,56	2,35	3,25
46	<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	M10	WT	20,25	11,25	1,22	2,65
115I	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	RM	WT	4,25	8,54	0,86	1,25
115II	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	RM	XY	6,52	9,54	0,98	1,35
109 I	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	RM	XY	41,25	26,52	2,35	8,58
106 III	<i>Olsenella uli</i>	RM	XY	32,25	8,85	2,54	7,58
23	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	M10	XY	25,45	16,54	5,21	3,2
147	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	RM	WT	12,52	10,52	0,85	2,21
109 II	<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	RM	WT	25,25	15,25	1,25	2,5
106 II	<i>Olsenella uli</i>	RM	WT	25,41	12,52	1,86	3,54
146 II	<i>Clostridium cochlearium</i>	RM	WT	4,56	8,45	1,22	2,54
205	<i>Clostridium cochlearium</i>	RM	WT	12,25	26,65	2,32	3,56
69	<i>Clostridium subterminale</i>	PYG	XY	12,85	10,95	1,24	2,32
J22	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	M10	CB	5,86	4,65	0,55	1,21
101I	<i>A. glycerinitolerans</i>	M10	CB	9,49	5,45	0,36	1,32
102II	<i>A. glycerinitolerans</i>	M10	CB	20,41	26,75	1,52	16,52

Z výsledků vyplývá, že bylo celkově izolováno 47 čistých bakteriálních kultur s celulolytickou aktivitou. Mezi jejich představitele patří *Streptococcus macedonicus*, *Bacteroides uniformis*, *Actinomyces ruminicola*, *Nekultivovaná Eubacterium sp.*, *Clostridium glycolicum*, *Clostridium butylicum*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium sartagoforme*, *Clostridium aminovalericum*, *Clostridium bifermetans*, *Clostridium sartagoforme*, *Clostridium thiosulfatireducens*, *Clostridium cochlearium*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Olsenella uli*, *Sporanaerobacter acetigenes*, *Streptococcus gallolyticus* a *Actinomyces glycerinitolerans*. Z dostupné literatury a taxonomie tyto druhy nepatří mezi celulolytické bakterie, ale my jsme celulolytickou a xylanolitickou aktivitu detekovali. V následujícím kroku jsme popsali a charakterizovali bakteriální kmen C10 a porovnali jsme jej již příbuzným popsáním druhem *Actinomyces succiniciruminis* a *Actinomyces glycerinitolerans*.

6.2.1. Popis a charakteristika kmene C10

Následující studie byla zaměřena charakterizaci celulolytických a xylanolytické bakterie, která byla izolována z batoru jelena evropského. V této analýze diskutujeme výsledky charakterizace nového celulolytického a xylanolytického kmene C10 z batoru jelena evropského, který je založen na identitě dílčích genů 16S rRNA, rpsA a rplB na *A. glycerinitolerans* / *A. succiniciruminis*. Genotypové a fenotypové srovnávací analýzy byly provedeny na zkoumaném kmeni a *A. ruminicola* DSM 27982T, třetí nejbližší příbuzný druh. Některé genotypové a fenotypové charakteristiky kmenů typu *A. glycerinitolerans* a *A. succiniciruminis* jsou také zahrnuty do současné studie. Prezentované výsledky rozšiřují charakteristiky bakterií zařazených do rodu *Actinomyces* pocházející z batoru různých přežvýkavců hlavně na struktuře peptidoglykanových a extracelulárních enzymových aktivit. Kromě toho je také uvedeno použití dvou nově navržených fylogenetických markerů amplifikovaných pomocí primerů specificky určených pro rod *Actinomyces*.

DNA izolovaného kmene C10 byla podrobena stanovení příbuznosti s ostatními bakteriemi, které jsou uvedeny výše. Dále byly provedeny v těchto třech bakteriích fylogenetické studie, založené na konstrukci fylogenetických stromků z databáze NCBI (tabulka 26).

Tabulka 26: NCBI čísla oblastí genomu v kmenech *Actinomyces* obsahujících sekvenční genu *rpsA* a *rplB*, které byly použity pro navrhování PCR primerů

<i>Actinomyces</i> strains / Gene	<i>rpsA</i>	<i>rplB</i>
<i>A. dentalis</i> DSM 19115 ^T	AUBL01000001	AUBL01000002
<i>A. georgiae</i> DSM 6843 ^T	AUBM01000008	AUBM01000006
<i>A. gerencseriae</i> DSM 6844 ^T	AUBN01000010	AUBN01000006
<i>A. graevenitzii</i> F0530	KE951478	AWSC01000014
<i>A. israelii</i> DSM 43320 ^T	JONS01000001	JONS01000002
<i>A. johnsonii</i> F0510	KE951657	KE951821
<i>A. massiliensis</i> F0489	AKFT01000116	AKFT01000002
<i>A. neuii</i> subsp. <i>neuii</i> DSM 8576 ^T	ATUW01000005	ATUW01000002
<i>A. odontolyticus</i> ATCC 17982 ^T	AAZI02000004	AAZI02000004
<i>A. oris</i> K20	BABV01000691	BABV01000551
<i>A. slackii</i> ATCC 49928 ^T	KE386779	KE386782
<i>A. timonensis</i> DSM 23838 ^T	JH806633	JH806632
<i>A. urogenitalis</i> DSM 15434 ^T	ACFH01000018	ACFH01000106
<i>A. vaccimaxillae</i> DSM 15804 ^T	ATUX01000006	ATUX01000005

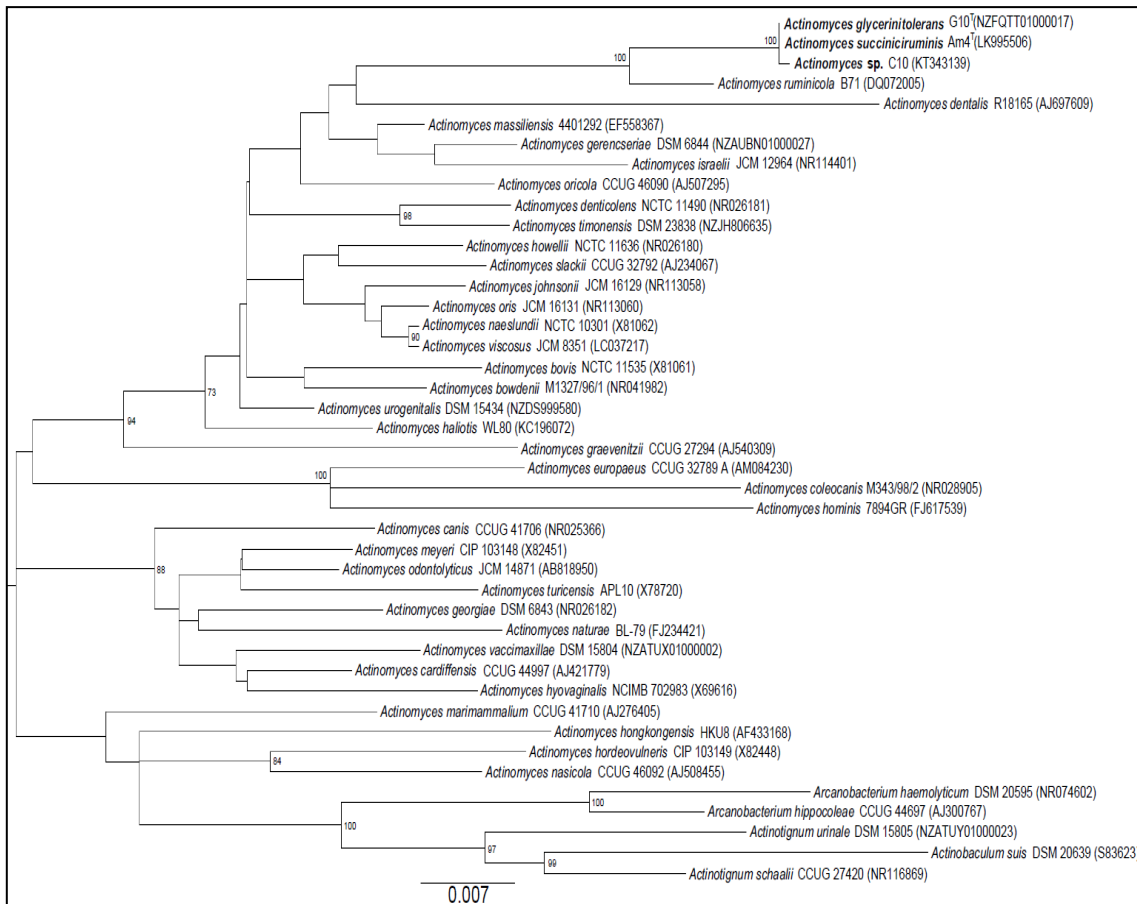
Genetická rozdílnost a fylogenetický vztahy kmenů byly hodnoceny pomocí parciálních sekvencí. Dále byla provedena fenotypová charakterizace založená na hodnocení fylogeneticky příbuzných bakteriálních kmenů se soustředilo na profilování buněčných mastných kyselin, stanovení rozsahu teploty růstu a pH, biochemické vlastnosti (schopnost fermentovat různé sacharidy, aktivitu specifických enzymů), stanovení specifické extracelulární aktivity enzymů, fermentačních produktů, buněčné morfologie, peptidoglykanové struktury a citlivosti na podmínky aerobního růstu. Buňky byly kultivovány za přísně anaerobních podmínek v modifikovaném PYG mediu. Toto růstové médium bylo také použito pro účely dalších fenotypových analýz. Teplotní rozsah a rozsah růstu pH byly testovány na základě metody (Killer et al., 2013). Schopnost fermentovat různé zdroje organického uhlíku a produkovat různé enzymy byly zkoumány pomocí testovacích proužků. Pro aktivity extracelulárních enzymů karboxymethylcelulasy (CMCase, endo-1,4-β-D-glukansy EC 3.2.1.4), celobiohydrolasy, glukosidasy (1,4-β-D-glukosidasy EC 3.2.1.21) a xylanasy (xylanasy, 1,4-β-D-xylanu xylanohydrolasy, EC 3.2.1.8), které jsou spojeny s celulytickými aktivitami u mikroorganismů (Hong et al., 2001), byly kultury kultivovány v modifikovaném PYG mediu obsahujícím různé substráty (0,8% hmotn./obj.) Podle stanovení specifického enzymu. Celulosa (Whatman CC41, Sigma-Aldrich),

karboxymethylcelulosa (Sigma-Aldrich), hemicelulosa ze slámy, xylan z bukového dřeva (TCI, Japonsko) a celobiosa (Sigma-Aldrich) byly použity jako jediný a definovaný zdroj organického uhlíku. Xylan a celobiosa byly použity pouze pro stanovení aktivity xylanasy a β -glukosidas. Bakterie byly kultivovány za striktně anaerobních podmínek při teplotě 39 °C po dobu 48 hodin. Enzymatické aktivity byly měřeny v supernatantu centrifugovaných (9000 x g, 20 min) buněk. Koncentrace nízkomolekulárních organických kyselin (mravenčí, jantarová, mléčná a octová) byly stanoveny izotachoforeticky kapilární elektroforézou.

Výsledky analýzy

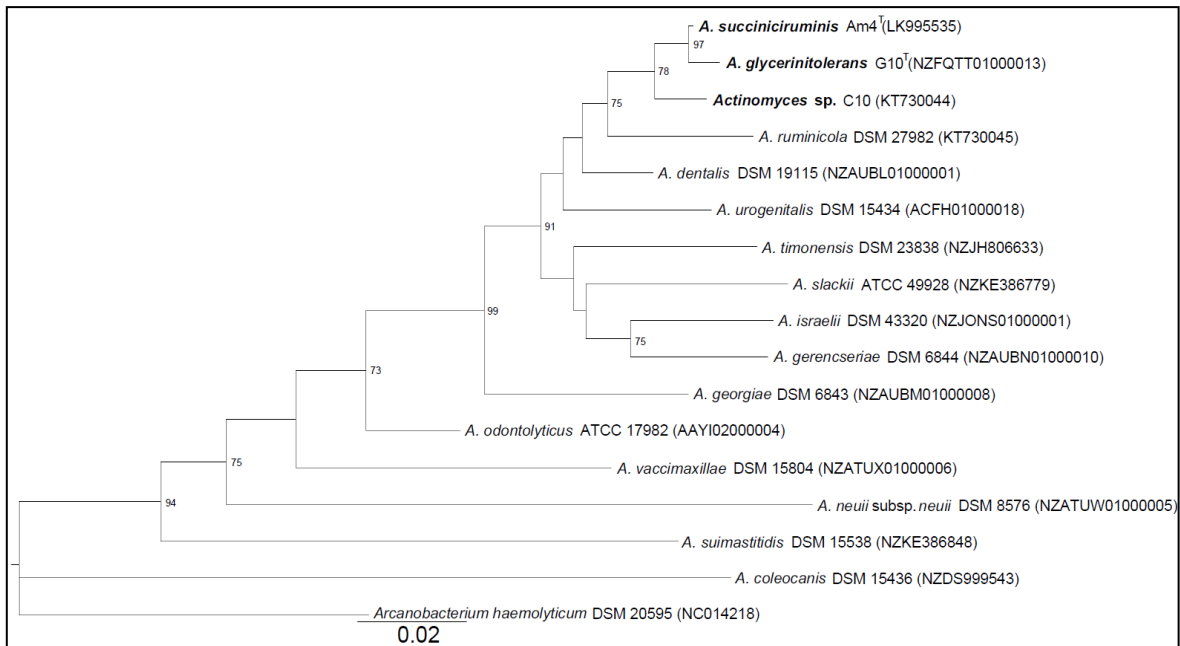
Nejbližšími kmeny C10 byly na základě identifikace genu 16S rRNA nedávno popsány *Actinomyces succiniciruminis* Am4T (NCBI a LK995506) a *A. glycerinitolerans* G10T (NCBI a NZFQTT01000017) s podobností 99,7 a 99,6%, následované *A. ruminicola* B71T (97,2%, DQ072005). Získané hodnoty obsahu C + G (67,1 mol%, SD = 0,32 ze tří nezávislých stanovení) u kmene C10, DDH kmene typu *A. ruminicola* (51,0% \pm 7,0) jsou srovnatelné s 68,5% 43,3%) s *A. succiniciruminis* Am4T a *A. glycerinitolerans* G10T (Palakawong et al., 2016).

Jak se očekáváno, všechny čtyři bakteriální kmeny C10, *A. glycerinitolerans* G10T, *A. succiniciruminis* Am4T a *A. ruminicola* B71T jsou shlukovány společně v rodu *Actinomyces* podle fylogenetické analýzy 16S rRNA (obrázek 33).

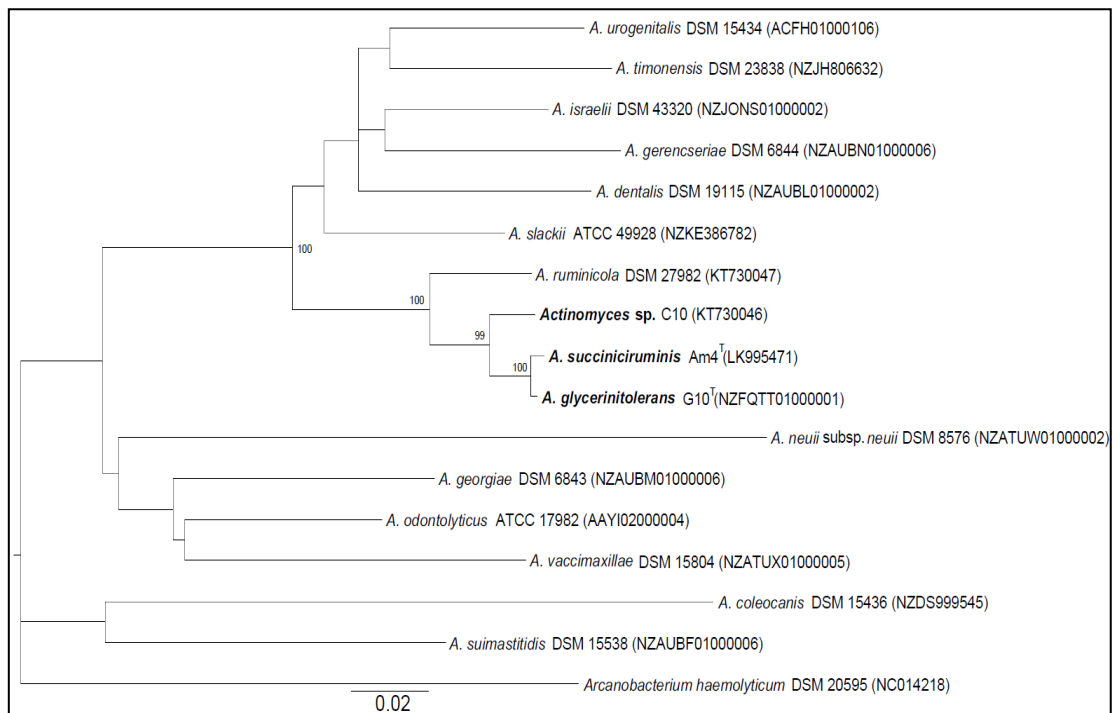


Obrázek 33 :Fylogenetický strom 16S rRNA (délka 1223 nt) zobrazující polohu kmene C10 v rodu *Actinomyces*, Hodnoty bootstrapu, vyjádřené jako procento 1000 datových sad (≥ 70), jsou uvedeny v uzlech. Čísla v závorkách odpovídají přístupovým číslům v databázi GenBank. Stromek byl sestaven na základě bootstrap. Bar, 0,007 substitucí na nukleotidovou pozici

Fylogenetické studie prováděné na základě fragmentů genu *rpsA* (obrázek 34) a *rplB* (obrázek 35) odhalily vztah i rozdíly mezi hodnocenými kmeny zařazenými do samostatné fylogenetické větve.

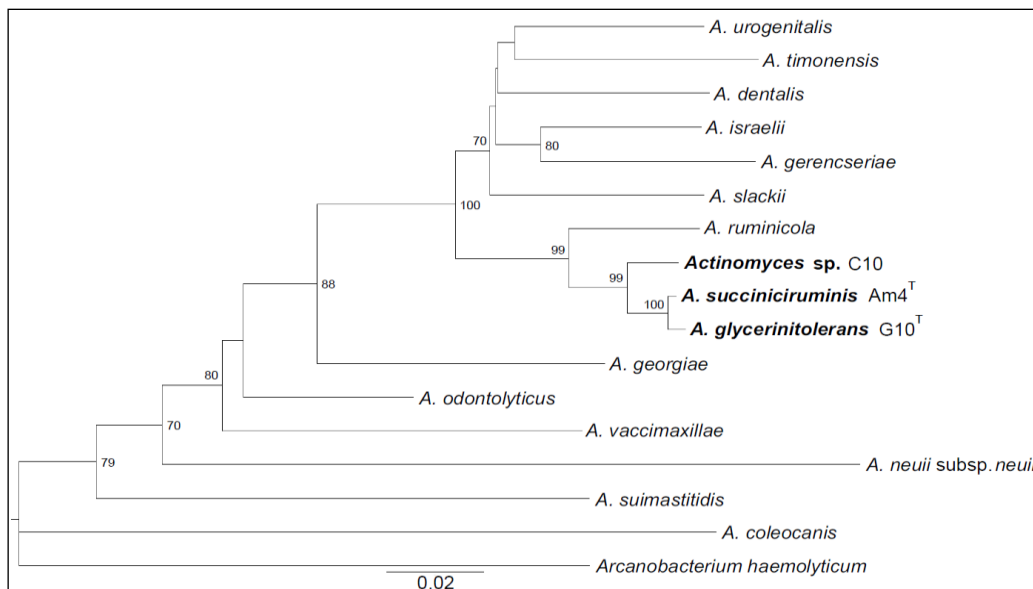


Obrázek 34: Fylogenetický strom založený na *rpsA* (délka 519 nts) ukazuje polohu vyhodnoceného kmene C10 v rodu *Actinomyces*. Hodnoty bootstrapu, vyjádřené jako procento 1000 datových sad (≥ 70). Čísla v závorkách odpovídají přístupovým číslům databáze GenBank. Stromek byl sestaven na základě *Arcanobacterium haemolyticum* DSM 20595T. Bar, 0,02 substituce na pozici nukleotidu

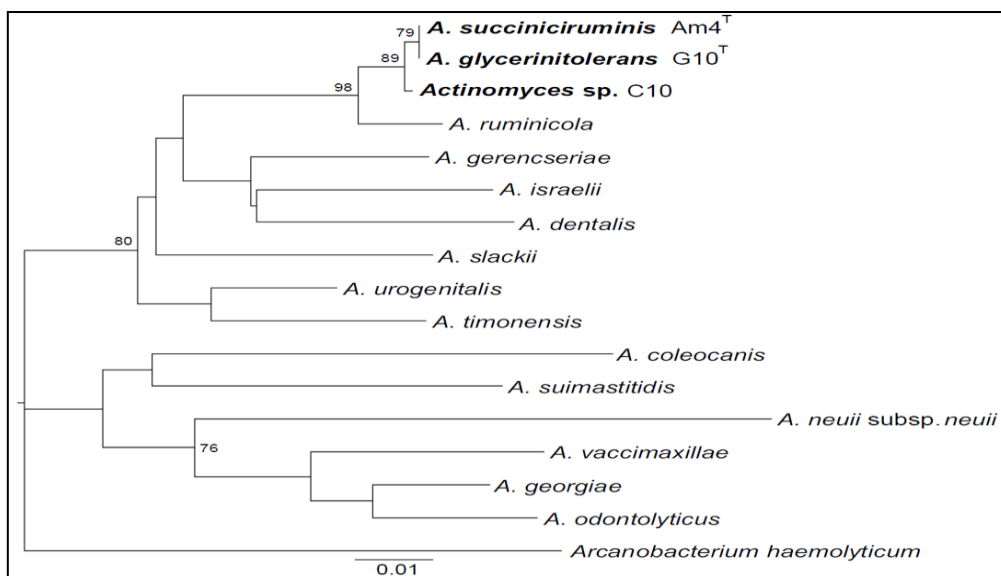


Obrázek 35 : Fylogenetický strom založený na *rplB* (délka 597 nts) ukazuje polohu studovaného kmene C10 v rodu *Actinomyces*. Hodnoty bootstrapu, vyjádřené jako procento 1000 datových sad (≥ 70), jsou uvedeny v uzlech. Čísla v závorkách odpovídají přístupovým číslům databáze GenBank. Stromek byl sestaven na základě *Arcanobacterium haemolyticum* DSM 20595T. Bar, 0,02 substituce na pozici nukleotidu

Topologie fylogenetických stromů rekonstruovaná na základě konkávního genu (délka 1116 nts) (obrázek 36) a aminokyselinových sekvencí (délka 372 aa) (obrázek 37) také potvrdila naše závěry.



Obrázek 36: Fylogenetický strom sestřený s využitím zřetěžených fragmentů genu *rpsA* + *rplB* (délka 1116 nts) znázorňující polohu studovaného kmene v rodu *Actinomyces*. Hodnoty bootstrapu, vyjádřené jako procento 1000 datových sad (≥ 70). Strom byl sestřen na základě *Arcanobacterium haemolyticum* DSM 20595T. Bar, 0,02 substituce na pozici nukleotidu



Obrázek 37: Fylogenetický strom rekonstruovaný na základě konteinovaných aminokyselinových sekvencí *rpsA* (173 aa) a *rplB* (199 aa) genových fragmentů. Ukazuje jak fylogenetický vztah, tak i rozdíl mezi *A. glycerinitolerans* C10 a *A. ruminicola* DSM 27982T. Pro sestření byl použit algoritmus s maximální pravděpodobností a model Jones-Taylor-Thorton implementovaný v softwaru MEGA 6.06. Hodnoty bootstrapu, vyjádřené jako procento 1000 datových sad (≥ 70). Bar, 0,01 substituce na aminokyselinovou pozici

Nicméně fylogenetické analýzy neumožnily zařazení sledovaného kmene určitému druhu. Proto se tento kmen označuje jako *Actinomyces* sp. C10. Vzhledem k navržení primerů založených na konsenzuální sekvenci odvozené z několika různých druhů *Actinomyces*, lze očekávat použitelnost při identifikaci, klasifikaci a fylogenezi rodu. Identity sekvencí rpsA a rplB genu mezi kmenem C10 jsou srovnatelné s kmeny *A. succiniciruminis* Am4T, *A. glycerinitolerans* G10T a *A. ruminicola* B71T porobnosti byly 98,5, 97,9, 97,7 a 97,5, 97,6, 94,8 %. Buněčné mastné kyseliny porvnané s buňkami profilujícími dva zkoumané bakteriální kmeny jsou srovnatelné. Výsledky *A. succiniciruminis* Am4T a *A.glycerinitolerans* G10T jsou uvedeny v tabulce 27.

Tabulka 27: Profily buněčných mastných kyselin fylogeneticky příbuzných bakteriálních kmenů. Byly vypočteny relativní koncentrace mastných kyselin (% hmotn./obj.). Jiné mastné kyseliny nebyly charakterizovány. * údaje jsou z příspěvku Palakawong et al. (2016)

Taxa / Fatty acid	<i>Actinomyces</i> sp. C10	<i>A. glycerinitolerans</i> G10 ^T *	<i>A. succiniciruminis</i> Am4 ^T *	<i>A. ruminicola</i> DSM 27982 ^T
C _{8:0}	11.7	-	-	-
C _{10:0}	4.5	2.9	1.3	10.0
C _{11:0}	8.2	-	-	4.6
C _{12:0}	6.9	4.8	3.3	6.9
C _{13:0}	-	-	-	7.5
C _{14:0}	5.1	4.4	3.4	-
C _{14:1}	7.9	-	-	4.9
C _{15:0}	-	-	-	3.4
C _{16:0}	16.2	38.0	40.1	19.0
C _{17:0}	4.7	-	-	3.4
C _{18:0}	-	1.3	1.7	3.7
C _{18:1ω9c}	27.8	33.5	31.2	24.4
C _{20:0}	7.0	-	-	-
C _{20:2}	3.1	-	-	-
C _{22:6ω3}	-	-	-	5.8
C _{22:2}	-	-	-	3.4

I když byly použity různé metodologie a média, hlavní mastné kyseliny zjištěné u kmenů C10 a G10T byly C16: 0 a C18: 1 ω 9c. Tyto výsledky také podporovaly vztah a rozdíl mezi kmeny C10, Am4T, G10T a *A. ruminicola*. Srovnatelné výsledky byly stanoveny u C10, *A. succiniciruminis* Am4T a *A. glycerinitolerans* G10T v případě fyziologických a biochemických vlastností, přestože byla použita různá kultivační média (tabulka 28). Všechny čtyři hodnocené kmeny se lišily použitím 13 substrátů

a aktivitou 12 enzymů. Výsledky *A. ruminicola* DSM 27982T byly poněkud odlišné ve srovnání s původními studiemi (An et al., 2006; Palakawong et al., 2016).

Tabulka 28: Různé fenotypové charakteristiky, obsah DNA G + C a stanoviště fylogeneticky příbuzných bakteriálních kmenů C10, G10T, Am4T a *A. ruminicola*. Všechny kmeny využívají L-arabinosu, D-xylózu, D-glukózu, D-fruktosu, L-ramnózu, inositol, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, celobiosu, maltosu, laktosu, melibiosu, sacharosu, trehalosu, rafinosu, škrob, glykogen a gentiobiosu. Žádná z nich neobsahuje kyselinu z glycerolu, erythritolu, D-arabinosu, L-xylosy, D-adonitolu, L-sorbosy, dulcitolu, methyl- α -D-manopyranosidu, D-tagatasy (slabě pozitivní reakce v G10T a Am4T), D-fukosa, L-fukosa, L-arabitol, glukonát draselný, 2-keto-glukonát draselný a 5-keto-glukonát draselný. Všechny kmeny jsou pozitivní pro β -galaktozidasu, β -glukozidasu, dekarboxylasu kyseliny glutamové, argininarylamidasu, prolin arylamidasu, fenylalaninarylamidasu, leucinarylmidu, tyrosin-arylmidu, alanin-arylmidu, glycin-arylmidu, histidin-arylmidu a serin-arylmidu. Všechny kmeny jsou negativní pro ureasu, arginin dihydrolasu, β -galaktozidasu-6-fosfát, N-acetyl- β -glukosaminidasu, α -arylmidu, trypsinu (slabě pozitivní reakce u *A. ruminicola*), α -chymotrypsinu, α -mannosidas (slabě pozitivní reakce u *A. glycerinitolerans* C10), hydrolyzy želatiny, katalasy a oxidasy. +, pozitivní reakce; (+), slabá pozitivní reakce; -, negativní reakce; ND, není určeno. * Údaje jsou ze studie Palakawong et al. (2016)

Strain / Characteristic	<i>Actinomyces</i> sp. C10	<i>A. glycerinitolerans</i> G10 ^T *	<i>A. succiniciruminis</i> Am4 ^T *	<i>A. ruminicola</i> DSM 27982 ^T
G + C content (%)	67.1	68.5	69.8	68.1 *
Peptidoglycan structure	A5 β L-Orn-L-Ala-L-Orn-D-Glu	ND	ND	A5 β L-Orn(L-Lys)-L-Ala-L-Orn(L-Lys)-D-Glu
Growth at low pH	≥ 5.0	≥ 5.5	≥ 5.5	≥ 5.5
Temperature range for growth (°C)	25-45	25-45	25-45	30-42
Habitat	Rumen of a red deer	Sheep rumen	Cow rumen	Cattle rumen
API 50 CHL :				
D-Ribose	+	+	+	-
methyl- α -D-Glucopyranoside	-	+	-	-
methyl- β -D-Xylopyranoside	-	+	-	+
D-Galactose	-	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	(+)
D-Mannitol	+	(+)	+	(+)
D-Sorbitol	+	(+)	+	-
Inulin	+	+	+	-
Melezitose	-	+	+	+
D-Turanose	(+)	+	+	+
D-Lyxose	(+)	+	+	+
D-Arabitol	+	+	+	-
D-Xylitol	-	+	+	-
Rapid ID 32A + API ZYM :				
α -Galactosidase	+	-	-	-
α -Glucosidase	+	+	-	+
α -Arabinosidase	+	+	+	-
β -Glucuronidase	(+)	+	(+)	-
Nitrate reduction	+	-	+	-
Leucyl glycine arylamidase	+	+	+	-
Esterase (C4)	(+)	-	-	-
Esterase lipase (C8)	(+)	-	-	-
Lipase (C14)	(+)	-	-	-
Valine arylamidase	+	-	-	-
Cystine arylamidase	+	ND	ND	-
Napthol-AS-BI-phosphohydrolase	-	+	(+)	(+)
Acid phosphatase	+	ND	ND	-

Výsledky průměrných extracelulárních enzymatických aktivit spojených s degradací celulosy jsou uvedeny v tabulce 29. Tyto výsledky odhalily, že enzymatické aktivity se liší mezi kmeny C10 a *A. ruminicola* a různé zdroje organického uhlíku ovlivňují výsledné aktivity. Obecně, kmen C10 měl vyšší aktivity CMCsy, CBHasy a XYLas a nižší u β -glukosidas na rozdíl od *A. ruminicola*. Tyto analýzy odhalily potenciální celulólytickou a silnou xylanolytickou schopnost u kmene C10. Bylo mnohokrát uvedeno, že podstatnými celulólytickými bakteriemi v bacheru jsou *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*. Nicméně několik druhů *Clostridium*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium* a *Eubacterium celulosolvens* jsou také známé jako fibrolytické druhy. Nedávno byli nalezeni členové rodů *Pseudobutyrvibrio*, *Butyrvibrio* a neklasifikovaná bakterie *Lachnospiraceae*, které patří do kmenu *Firmicutes* (Nyonyo et al., 2014), převládající celulólytické a xylanolytické bakterie. Enzymatické aktivity spojené se schopností degradovat celulosu a xylan nebyly pozorovány u žádného druhu *Actinomyces*. Nicméně lignocelulólytické a xylanolytické enzymy byly detekovány u některých *Actinomycetů*, zejména u zástupců rodu *Streptomyces* (Zimmermann et al., 1988; Saini et al., 2015).

Tabulka 29: Enzymatické aktivity ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 1\text{mg proteinu}^{-1}$) spojené s celulólytickou schopností. Enzymy: CMC - karboxymethylcelulosa; CBH - celobiohydrolasa; XYL - xylanáza. Substráty, na kterých byly kultury kultivovány: CP - prášek z celulosy (Whatman CC41, Sigma-Aldrich); CMC - karboxymethylcelulosa (Sigma-Aldrich), HEM - hemicelulosa ze slámy; XYL - xylan z bukového dřeva (TCI, Japonsko); CB-cellobióza (Sigma-Aldrich)

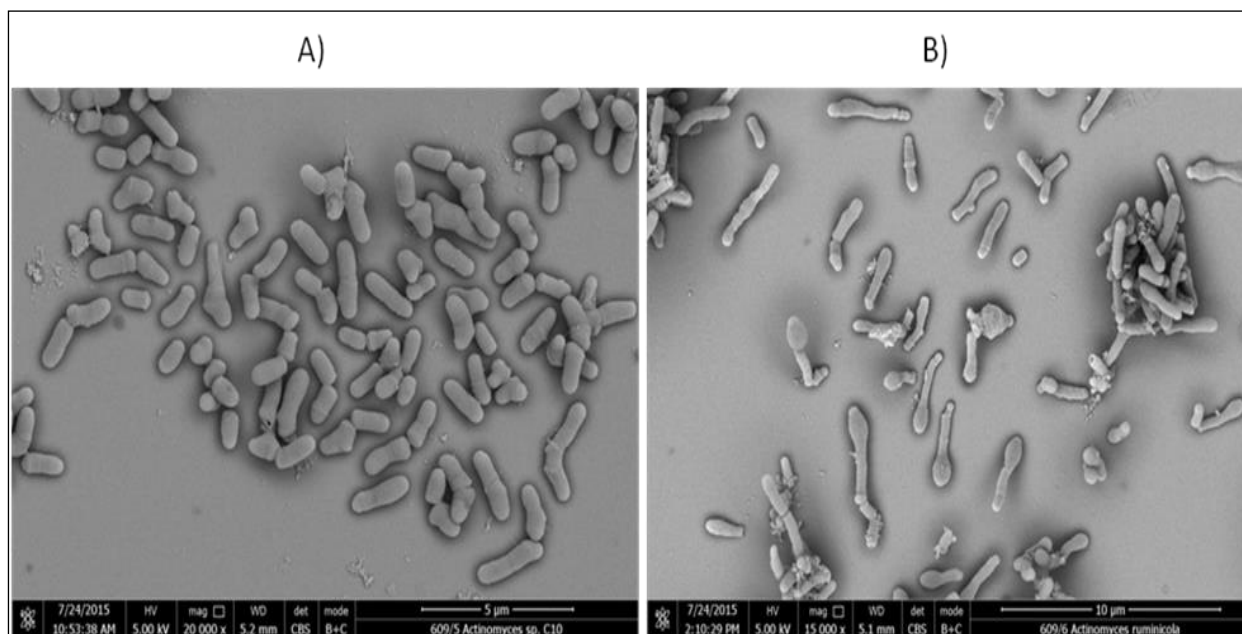
Strain / Enzymes	Substrate	<i>A. glycerinitolerans</i> C10	<i>A. ruminicola</i> DSM 27982 ^T
CMCases	CP	7.61	5.53
	CMC	19.96	4.42
	HEM	20.35	20.09
CBHases	CP	0.38	0.19
	CMC	2.00	0.24
	HEM	0.52	0.29
XYLases	CP	18.82	7.51
	CMC	14.94	11.39
	HEM	14.09	15.61
	XYL	54.01	15.50
β -Glucosidases	CP	3.66	2.54
	CMC	1.70	2.19
	HEM	1.20	21.76
	CB	13.03	25.18

Analýzy SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem) určily kyselinu mléčnou, jantarovou, octovou a mravenčí jako konečné produkty fermentace na různých substrátech u C10 i *A. ruminicola* DSM 27982T (tabulka 30). Kyselina mléčná byla stanovena při nejvyšší koncentraci na všech použitých substrátech, následoval sukcinát, kyselina octová a kyselina mravenčí. V kombinaci s kmenem C10, kmenem *A. ruminicola* B71T vzniklo více kyseliny mravenčí. Jak bylo očekáváno, poměr SCFAs produkovaných z kmenů pěstovaných na různých zdrojích uhlíku se lišil (tabulka č.). Pokud jde o kmen C10, Palakawong et al. (2016) stanovil srovnatelnou stechiometrii fermentačních produktů na glukose v *A. glycerinitolerans* G10T a *A. succiniciruminis* Am4T. Na rozdíl od našich výsledků byla stanovena nižší hladina kyseliny mléčné. Mohlo by to být ovlivněno různým použitým médiem. Kyselina mravenčí, dále kyselinou octová a kyselinou mléčná byly analyzovány jako převládající konečné produkty fermentace glukosy v původní studii popisující nové druhy *Actinomyces ruminicola* (Anet al., 2006).

Tabulka 30 :Rozdíly v koncentraci SCFA (mM) stanovené ve dvou hodnocených kmenech, *A. glycerinitolerans* C10 a *A. ruminicola* DSM 27982T napěstovaných na různých substrátech: G - glukosa; CB - celobiosa; XY - xylan; HEM - hemicelulosa; CMC - karboxymethylcelulosa; CP - celulosový prášek

Kmen	Fatty acid / Substrate	Lactic acid	Succinic acid	Acetic acid	Formic acid
C10	G	9.1	4.6	3.3	1.7
	CB	7.6	3.1	4.1	1.0
	XY	4.5	2.0	2.6	2.6
	HEM	7.2	4.1	2.5	2.8
	CMC	4.0	1.7	2.3	0.9
	CP	5.0	1.9	2.2	1.1
<i>A. ruminicola</i>	G	8.2	3.6	2.4	2.3
	CB	7.1	3.7	2.1	3.0
	XY	3.8	1.1	2.6	3.0
	HEM	7.0	3.0	2.3	3.3
	CMC	3.2	0.8	2.7	2.6
	CP	3.9	2.0	2.5	2.8

Buněčná morfologie kmene C10 je velmi podobná té, která je pozorována u *A. glycerinitolerans* G10T (Palakawong a kol., 2016) a odlišná od *A. ruminicola* (obrázek 38).



Obrázek 38 : Podrobná morfologie buněk: A) *A. glycerinitolerans* C10 a B) *A. ruminicola* DSM 27982T byla analyzována za použití skenovací elektronové mikroskopie. Morfologie se liší především délkou buněk a tvarem buněčných konců

Zjištěné typy peptidoglykanů u bakteriálních kmenů C10 a *A. ruminicola* DSM 27982T, L-Orn-L-Ala-L-Orn-D-Glu (pravděpodobně variace typu A5p) a L-Orn -Ala-L-Orn (L-Lys) -D-Glu (pravděpodobně také variace typu A5p) nebyly dosud stanoveny pro žádný bakteriální izolát. Poměry molárních aminokyselin ve dvou peptidoglykaech byly 1,8 Ala: 0,9 Orn: 2,0 Glu a 1,5 Ala: 0,6 Ser: 2,0 Glu: 0,8 Orn: 0,3 Lys.

Oba kmeny, podobně jako byly zmíněny v Palakawong et al. (2016) u *A. glycerinitolerans* a *A. succinicipurinis*, mají schopnost růstu za aerobních podmínek. Závěrem jsou výsledky genotypových a fenotypových charakteristik zkoumaného bakteriálního izolátu *Actinomyces* sp. C10 blízce příbuzné druhům *A. glycerinitolerans* a *A. succinicipurinis* na základě 16S rRNA, rpsA a rplB genové sekvenční podobnosti a fylogenetické analýzy, což potvrdil taxonomický rozdíl od druhu *A. ruminicola*. Naše výsledky rozšiřují charakterizaci kmenů *Actinomyces*, které se vyskytují v batoru různých přežvýkavců, na bázi izolátu z batoru jelena evropského, hlavně peptidoglykanové struktury a specifické extracelulární aktivity enzymů spojených se schopností štěpit celulosu a xylan. Bakteriální izolát C10 vykazoval podobné genotypové a fenotypové vlastnosti vůči *A.*

succiniciruminans Am4T a *A. glycerinitolerans* G10T (Palakawong et al., 2016). Byly však pozorovány slabé rozdíly. Přítomnost v bachoru divokých přežvýkavců naznačuje, že fylogeneticky příbuzné kmeny nedávno charakterizovaných druhů mohou obývat nejen trávicí trakt domácích přežvýkavců (Seo et al., 2013). Kvůli vztahu studovaného kmene s výše uvedenými dvěma druhy musí být jeho zařazení na úrovni druhů provedeno pomocí komplexního genomového srovnání nebo sofistikované MPSV (multicocus sequence analysis) v budoucnu.

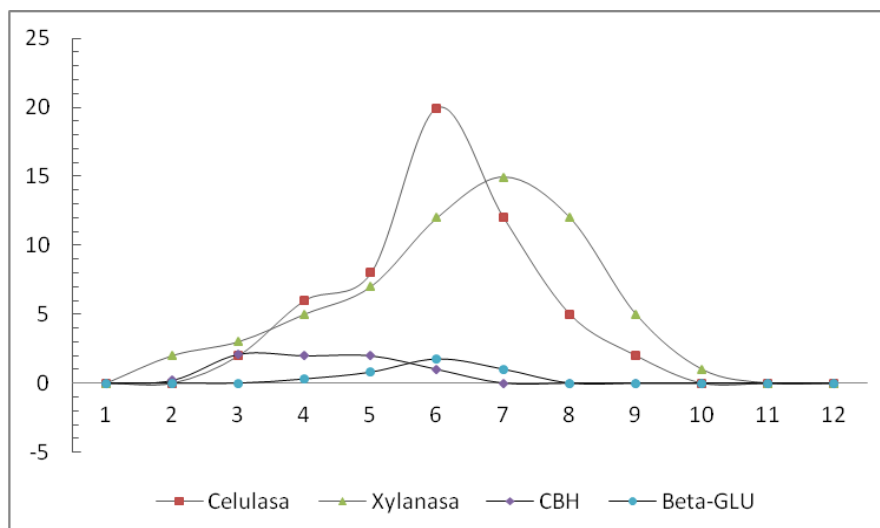
6.3. Purifikace a charakterizace enzymu kmene C10

V průběhu této práce byla izolována celá řada bakterií schopných efektivně se podílet na degradaci vlákniny. Jejich přehled a zejména úroveň jejich aktivit je sumarizován v tabulce č. 24 Pro proteomickou charakteristiku celulolytického organismu izolovaného z bachorového obsahu jelena evropského jsme zvolili méně běžný mikroorganismus *Actinomyces glycerinitolerans* C10 jednak s ohledem na jeho určitou výjimečnost v této metabolické skupině mikroorganismů, dále především proto, že jsme se studiu tohoto mikroorganismu věnovali detailněji a deponovali jej jako nový izolát do dvou významných Evropských sbírek kultur mikroorganismů a jeho schopnosti štěpit celulosu a xylan jsou poměrně značné. Kromě toho jsme chtěli tímto studiem přispět k většímu poznání mimořádné skupiny aktinomycet, které jsou dosud považovány spíše za méně významné mikroorganismy bachorové mikrobioty, ale publikační aktivity řady mikrobiologických pracovišť z nedávného období ukazují na jejich značný potenciál (Palakawong et al., 2017).

Detailní popis a charakteristika *Actinomyces glycerinitolerans* C10 jsou uvedeny v předchozím textu a zejména v naší citované práci. V následujících experimentech jsme se pokusili provést základní proteomickou studii zejména s ohledem na charakterizaci a mapování proteinů technikami založenými na PAG. Od konečné detailní proteomické charakterizace jsme s ohledem na rozsah a nákladnost tohoto postupu, zejména hmotnostních studií pomocí MALDI-metod, upustili.

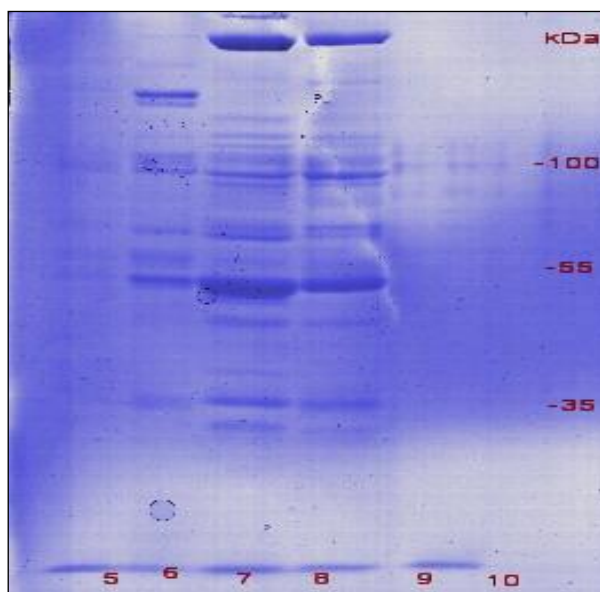
6.3.1. Gelové filtrace na Sephadexu

Gelová filtrace byla provedena na Sephadexu G-75 nanesením 1 ml vzorku ultrafiltrací zahuštěného media z kultury C10 ve stacionární fázi růstu. V jednotlivých frakcích byly stanoveny aktivity enzymů celulasy, xylanasy, celobiohydrolasy a beta-glukosidasy a přepočítány jako specifické aktivity s ohledem na obsah proteinu. Výsledný průběh této purifikace je zřejmý na obrázku 39.



Obrázek 39: Specifická enzymová aktivita ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 1\text{mg proteinu}^{-1}$) CM celulasy, CMxylanasy, celobiohydrolasy a beta-glukosidasy v kultuře C-10 v jednotlivých frakcích zahuštěného media M-10 po dělení na gelové filtraci

Z uvedených výsledků je zřejmé, že gelová filtrace na Sephadexu při přípravě vzorků pro další studium není dostatečně efektivní separační postup k rozdělení jednotlivých proteinových frakcí, jak je patrné z poměrně značného množství bandů v nejbohatších frakcích 6, 7 a 8 (obrázek 40), které jsou navíc v širokém rozmezí z hlediska jejich molekulové hmotnosti. Lze však předpokládat, že tento krok napomohl k purifikaci frakcí odstraněním celé řady zejména nízkomolekulárních látek nebilkovinného charakteru, které jsou součástí kultivačního media (zejména při použití media M-10 s přidavkem bachorové tekutiny).



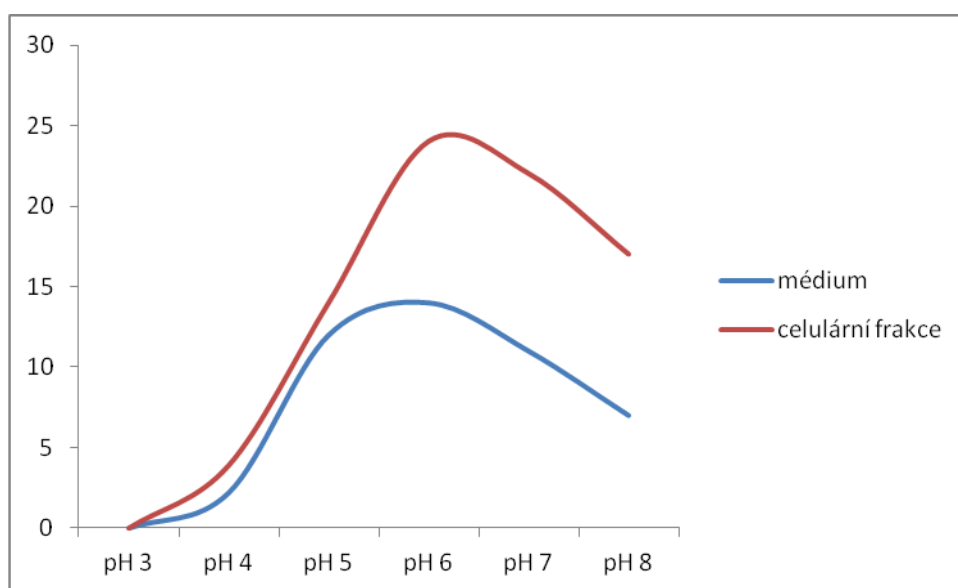
Obrázek 40: ELFO PAGE proteinů v kultuře C-10 v jednotlivých frakcích zahuštěného media M-10 po dělení na gelové filtraci SEPHADEX G-75. Barveno Commasie blue

6.4. Stanovení vlastností enzymu CM-celulasy (pH optimum, teplotní optimum stanovení inhibičního spektra)

6.4.1. Stanovení pH optima

Každý enzym vyžaduje pro dosažení optimální účinnosti specifickou koncentraci vodíkových iontů H^+ , nejen proto, že reakční mechanismus vyžaduje kyselé či zásadité prostředí, ale také proto, že konformace proteinu závisí na náboji vazebných skupin. Stanovení optimálního pH je proto velmi důležitou charakteristikou enzymu, která je významná i pro vytvoření optimálního prostředí při dalším studiu enzymu. Stanovení optimálního pH pro aktivitu enzymů schopných hydrolyzovat CM-celulosu jsme provedli extracelulární a celulární frakci kultury *A. glycerinitolerans*.

Výsledky jsou znázorněny na obrázku 41. Z naměřených hodnot vyplývá, že optimální pH se liší pro extracelulární a na buňku vázanou enzymovou aktivitu. Zatímco enzym uvolňovaný do média vykazoval nejvyšší aktivitu při přibližně pH 5,5, enzymová aktivita vázaná na buňky vykazovala nejvyšší aktivitu přibližně při pH 6,5. Při hodnotách pH pod 4 a vyšších než 8 aktivita v obou frakcích dramaticky poklesla.

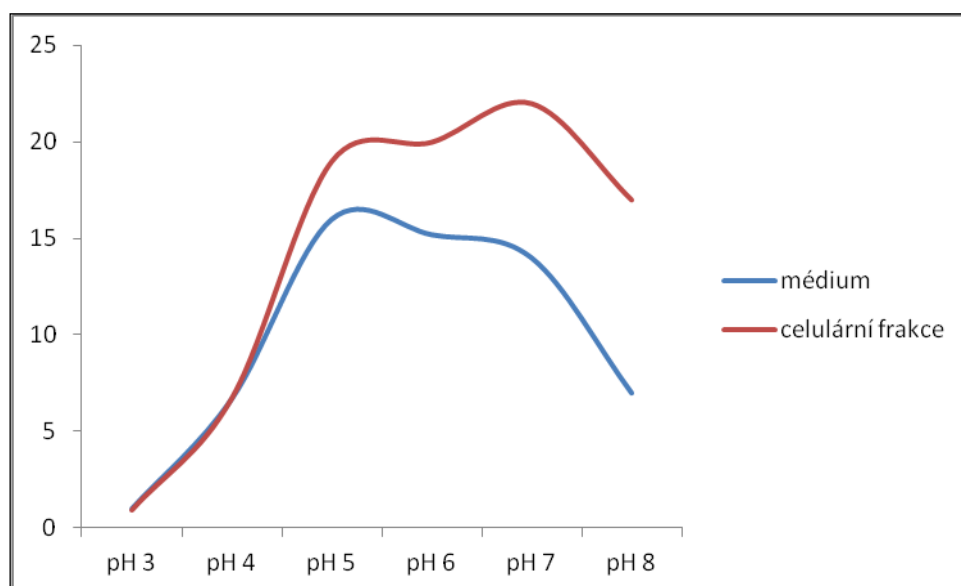


Obrázek 41: Specifická aktivita CM-celulasy ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 1\text{mg proteinu}^{-1}$) v mediu a v buněčné frakci v závislosti na pH reakčního prostředí

6.4.2. Stabilita pH

Jednou z důležitých charakteristik enzymu je jeho stabilita enzymu za různých reakčních podmínek. Aktivitu CM-celulasy jsme stanovovali v extracelulární a celulární

frakci zahuštěné kultury C10 pěstované na mediu M10 v reakčním prostředí o rozdílném pH, v tomto experimentu však byla inkubační doba prodloužena na tři hodiny. Dosažené výsledky jsou znázorněny na obrázku 42. Z výsledků je zřejmé, že vyčist, že extracelulární i celulární aktivita CM-celulasy vykazuje velmi dobrou stabilitu v rozmezí přibližně pH 4,5-7,5. Při pH 8 a vyšším a naopak 4 a nižším dochází k výraznému poklesu aktivit pravděpodobně v důsledku denaturace enzymu. Naše výsledky jsou ve shodě s hodnotami pH optima a pH stability stanovenými pro celulólytickou bachorovou bakterii *Bacillus licheniformis*, u níž byla zjištěna jenom poněkud nižší pH stabilita u hodnot pH 7-8 (Seo et al., 2013). Stabilita při pH v rozmezí 4-7 zcela odpovídá hodnotám pH v bachoru i změnám v závislosti na průběhu fermentace v průběhu dne.



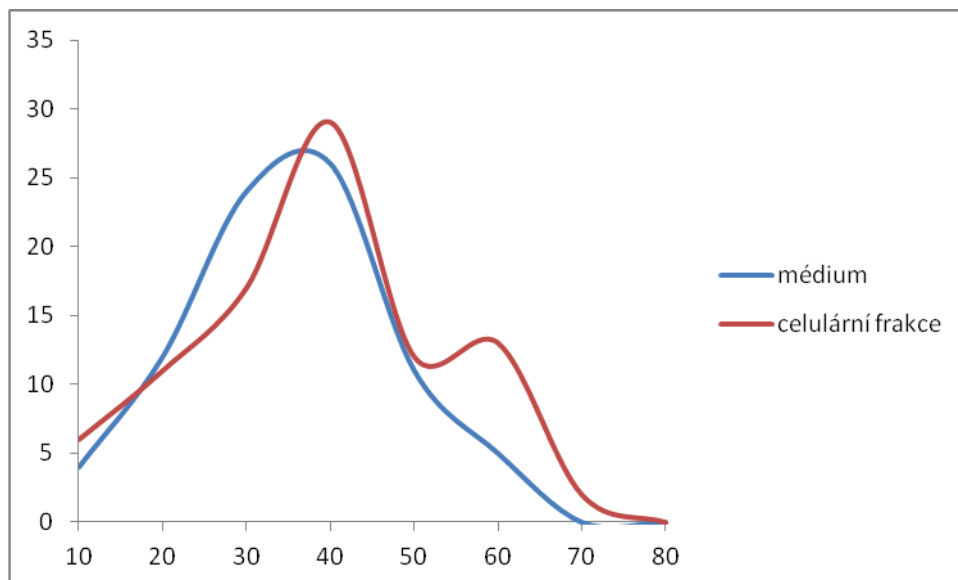
Obrázek 42: Stabilita specifické aktivity CM-celulasy ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 1\text{mg}\text{ proteinu}^{-1}$) v mediu a v buněčné frakci v závislosti na pH reakčního prostředí po 3 hodinové inkubaci

6.4.3. Stanovení teplotního optima

Aktivita enzymů narůstá se vzrůstající teplotou až do bodu, kdy termální energie začne narušovat proteinové vazby, po dosažení určité kritické teploty se celá konformace zhroutí a dojde k denaturaci proteinu-enzymu. Optimální reakční teplota je proto významnou charakteristikou enzymu. Ověřovali jsme optimální teplotu pro aktivitu CM-celulasy v celulární a extracelulární frakci kmene C10.

Výsledky jsou graficky znázorněny na obrázku 43. Z naměřených hodnot vyplývá, že optimální reakční teplota je u obou studovaných frakcí obdobná. Nejvyšší aktivita proti CM-celulose byla naměřena v rozmezí teplot 30-40, z průběhu křivek lze odhadnout až 45°C. Lze říci, že tyto hodnoty korespondují s fyziologickým rozmezí hodnot měřitelných v bachoru

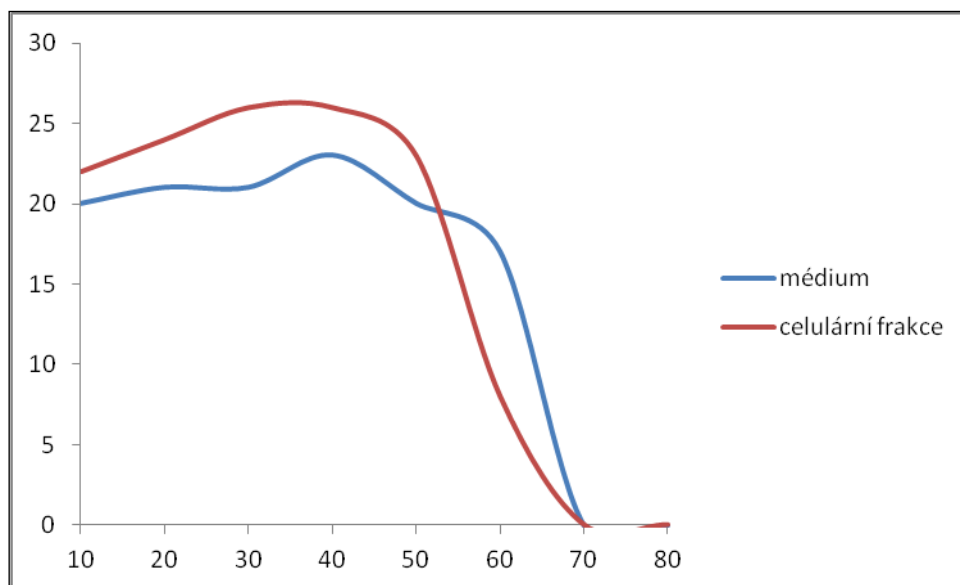
přežvýkavců. Při teplotách nad 50°C specifické enzymové aktivity u obou sledovaných frakcí prudce poklesly, u celulární frakce jsme naměřili ještě mírné přetrvání aktivity při 60 °C a prudký pokles nastal teprve při dalším zvýšení teploty.



Obrázek 43: Specifická aktivita CM-celulasy ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 1\text{mg proteinu}^{-1}$) v mediu a v buněčné frakci v závislosti na teplotě reakčního prostředí

6.4.4. Stanovení teplotní stability

Teplotní stabilita specifické enzymové aktivity proti CM-celulase byla měřena v celulární a extracelulární frakci kmene C10. Vzorky enzymů byly vystaveny působení různých inkubačních teplot po dobu 1 hodiny. Z výsledků, které jsou znázorněny na obrázku 44, je zřejmé, že oba testované vzorky jsou stabilní nejenom při své optimální teplotě 30 - 45°C, ale vysokou stabilitu vykazují v širokém rozsahu od 10 do 50°C. Při teplotě 60°C a vyšší vykazují tyto enzymové aktivity vysokou nestabilitu a jejich aktivita se prudce snižuje.



Obrázek 44: Teplotní stabilita specifické aktivity CM-celulasy ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 1\text{mg proteinu}^{-1}$) v mediu a v buněčné frakci v závislosti na teplotě reakčního prostředí při 1 hodinové inkubaci

Seo a kol. (2013) u celulólytické bakterie *Bacillus licheniformis* JK7 našli na rozdíl od našich zjištění výrazně vyšší stabilitu endoglukanasy i při teplotách 70 a 80°C. Jako teplotní optimum celulas u tohoto bacherového mikroorganismu uvádějí 70°C, což s ohledem na fyziologickou teplotu v bacheru kolem 40°C je překvapivé a obtížně vysvětlitelné.

6.4.5. Vliv iontů a chemikálií na aktivitu CM-celulasy

Aktivitu enzymu mohou ovlivnit látky, které blokují aktivní místo nebo mění konformaci enzymu, která vede ke změně katalytické aktivity. Ověřovali jsme proto aktivační či inhibiční účinek 16 látek na aktivitu enzymu štěpícího CM-celulosu v buněčné a extracelulární frakci kultury C10. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 31, která popisuje vliv kovových iontů na aktivitu CM-celulasy a tabulce 32, která shrnuje vliv různých chemických látek na tentýž enzym. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech. 100 % aktivita je přitom aktivita CM-celulasy, která byla hodinu inkubována při 40°C jen v čistém 100 mM fosfátovém pufru pH 6 bez přídavku jakéhokoliv iontu nebo chemikálie. Z výsledků vyplývají tyto závěry. Inkubace s draslíkem a hořčíkem vedlo k mírnému zvýšení aktivity enzymu, naopak inkubace s kobaltem vedla k inhibici enzymů v průměru o 19 % a s manganem až o 60 %. Inkubace s baryem měla mírný aktivační vliv na buněčnou i extracelulární CM-celulasu. Většina sledovaných chemikálií měla inhibiční vliv na enzymatickou aktivitu. Jako největší inhibitory se projevíly dvě látky, SDS a thimerosal, které při vyšší koncentraci (10mM) výrazně potlačily či zcela deaktivovaly CM-celulasovou aktivitu. Poměrně významným inhibitorem se ukázala být i EDTA, která při běžně používané 1mM koncentraci vyvolala pokles aktivity

CM-celulasy. Naopak mírný aktivační účinek prokázal iodoacetamid a 1 mM kyselina iodoctová (při vyšší koncentraci již došlo k inhibici).

Tabulka 31: Vliv iontů na aktivitu CM-celulasy v mediu a buněčné frakci kmene C10 vztažený procentuálně k aktivitě neovlivněného enzymu

Ionty kovů	Koncentrace (mM)	Relativní aktivita(%)	
		<i>Buněčná frakce</i>	<i>Medium</i>
Bez iontů		100,00	100,00
MnCl ₂	1	81,92	70,16
KCl	1;10	98,23;101,20	105,12;97,33
HgCl ₂	1;10	71,51;21,10	51,12;15,16
BaCl ₂	1	100,39	102,17
CoCl ₂	1	52,27	81,39
MgCl ₂	1;10	109,00;115,34	102,78;95,15
FeCl ₃	1;10	110,01;102,52	120,12;101,37

Tabulka 32: Vliv chemických látek na aktivitu CM-celulasy v mediu a buněčné frakci kmene C10 vztažený procentuálně k aktivitě neovlivněného enzymu

Chemikálie	Koncentrace (mM)	Relativní aktivita(%)	
		<i>Buněčná frakce</i>	<i>Medium</i>
L-cystein	1;10	91,04;71,54	70,99;51,50
EDTA	1;10	97,28;78,65	89,25;38,15
SDS	1;10	80,19;2,58	39,14;6,79
dithiothreitol	1;10	81,32;67,17	69,25;37,63
kyselina iodoctová	1;10	105,14;95,07	119,21;69,99
thimerosal	1;10	68,13;39,27	51,10;32,19
merkptoethanol	1;10	9266;69,13	58,61;34,35
idoacetamid	1;10	113,21;99,32	114,54;91,28
phenylmethyl-sulfonyl fluorid	1	73,25	55,13

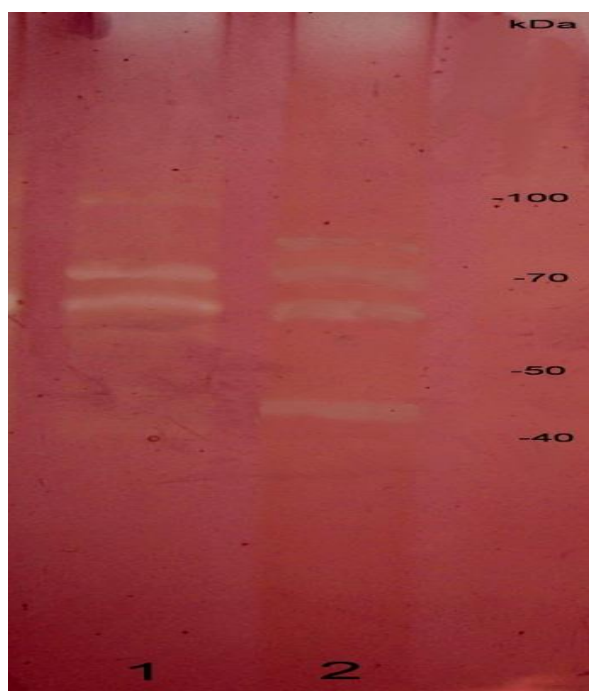
V případě CM-celulasy kmene C10 jsme našli významný inhibiční vliv na aktivitu tohoto enzymu v přítomnosti Mn²⁺, Hg²⁺ a Co²⁺. Zcela opačné výsledky obdrželi

Karnchanatat et al. (2007) u endoglukanas dřevokazných hub. Obdobně v přítomnosti Mg^{2+} a Fe^{3+} byla tato aktivita u C10 stimulována, citovaní autoři popisují zcela opačný efekt. Inhibiční účinek kovových iontů na aktivitu enzymů naznačuje přítomnost sulfhydrylových skupin v aktivním centru enzymu, kde oxidace těmito ionty destabilizuje konformaci enzymové molekuly. Znalosti o stimulačních nebo inhibičních vlivech na enzymové aktivity jsou velmi důležité zejména pro přípravu reakčního prostředí pro využití nebo testování enzymů-. Z toho pohledu je zejména zajímavé zjištění o výrazném inhibičním účinku thimerosalu a phenylsulfonyl fluoridu na aktivitu CM-celulasy, neboť tyto látky jsou často komponentou roztoků a pufrů používaných v proteomice a mohly by významným způsobem ovlivnit experimentální nálezy.

6.5. Zymografie celulosové aktivity na CMC PAGE a stanovení molekulové hmotnosti isoform endocelulasy

Kultura *Actinomyces glycerinitolerans* C10 byla kultivována při 39°C v médiu M10. Jako zdroj uhlíku v médiu byla použita carboxymethylcelulosa (4g/l). Isoformy celulasy v zahuštěném médiu a celulární frakci byly vizualizovány pomocí zymografické metody: SDS-elektroforézy s CM-xylanem zakomponovaným do gelu (Obrázek č.) srovnává molekulové hmotnosti isoform endocelulasy detekované v extracelulární a celulární frakci. Ze zymogramu je zřejmé, že v mediu byly detekovány přinejmenším 3 výrazné bandy s endocelulasovou aktivitou štěpící CM-celulosu (proužek 1) s molekulovou hmotností přibližně 100 kDa, 70 kDa a 63 kDa. V buněčné frakci (proužek 2) jsme detekovali 2 isoenzymy o stejné molekulové hmotnosti (70 a 63 kDa), navíc jsme našli 2 další isoenzymy s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa a 45 kDa, naopak isoenzym s největší molekulovou hmotností jsme v celulární frakci nedetekovali. Bachorové mikroorganismy s celulytickou aktivitou představují významnou skupinu mikroorganismů podmiňující svojí aktivitou základní potravní strategii přežvýkavců založenou a degradaci vlákniny. O vlastnostech, struktuře a funkci celulas bachorových mikroorganismů pojednává rozsáhlá vědecká literatura (např. Gilbert and Hazlewood 1993; Nyonyo et al., 2014). Jedná se o velmi rozsáhlou skupinu enzymů, spíše se hovoří o komplexu enzymů. V obecné rovině je tento systém složen ze tří hlavních komponent: endo-L- (EC 3.2.1.4), exo-L-glucanasy (EC 3.2.1.91) a L-glucosidasy, (EC 3.2.1.21), přičemž enzymy působící proti CM celulóse patří k prvnímu z nich a bývají označovány jako carboxymethylcelulasa (Bhat et al., 2000). Tento enzym bývá pro degradaci celulosy klíčový. Zastoupení aktivních bandů viditelných na

zymogramu na obrázku 45 - potvrzují, že tento enzym je zastoupen i u kmenu C10 a koresponduje se schopností této bakterie využívat celulosu jako zdroj uhlíku.



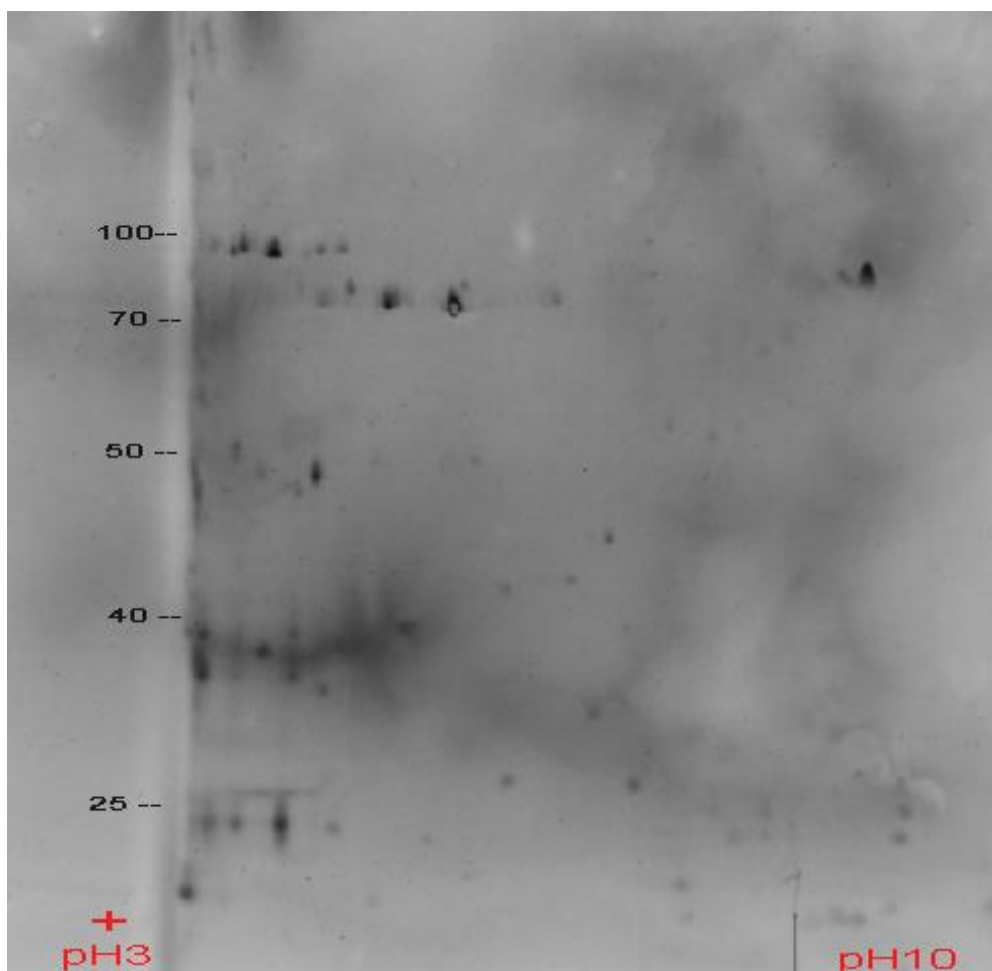
Obrázek 45: Zymografická vizualizace proteinů aktivních při štěpení CMC (endocelulasy) v mediu (proužek 1) a buněčné frakci (proužek 2) na PAG s přidavkem karboxymetylcelulosity

6.6. Dvourozměrná elektroforéza proteinů kmene

2D-PAGE je vysoce efektivní separační metodou umožňující rozdělení komplikovaných směsí stovek různých bílkovin a představuje základní nástroj v novém rozvíjejícím se směru proteomiky. Je kombinací isoelektrické fokusace (IEF) a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Obě separace se provádějí postupně tak, že nejprve se provede isoelektrická fokusace na proužku gelu s imobilisovaným pH gradientem (IPG), kdy se bílkoviny rozdělí podle svých isoelektrických bodů (pI). Rozsah gradientu pH je udán výrobcem a pI skvrn lze určit podle její polohy. Proteiny se nejprve rozdělí podle svých isoelektrických bodů v gradientu pH. Po separaci v prvním rozměru je provedena SDS-elektroforéza v druhém směru, bílkoviny se rozdělí podle své velikosti.

Na rozdíl od předešlých metod, jejichž výsledkem jsou frakce obsahující často směs několika bílkovin, 2D elektroforéza umožňuje izolovat jednotlivé proteiny v rámci proteomické charakteristiky mikroorganismu. V našem případě jsme metodu 2-D PAGE použili pouze k vizualizaci proteinů rozdělených nejenom na základě jejich migrační pohyblivosti, ale i pI, což umožní zjistit celé spektrum jednotlivých proteinů (obrázek 46). Ty

lze dále studovat na základě hmotnostní analýzy (MALDI), v našem případě by však tyto metodické přístupy přesahovaly rozsah studované problematiky a 2D metodu jsme použili jako ilustrační. Na elektroforegramu je zřejmé rozdělení proteinů s přibližně stejnou molekulovou hmotností ve vodorovném směru na základě jejich odlišného pI. Jednotlivé spoty nebyly dále analyzovány.



Obrázek 46: 2D-PAGE elektroforegram proteinů celulární frakce *A. glycerinitolerans* C10 po isoelektrické fokusaci v gradientu pH 3-10. Barveno Sypro ruby.

7. ZÁVĚR

Tato práce si kladla za cíl hlubší poznání struktury a funkce mikrobiomu bachoru volně žijících přežvýkavců na území České republiky, především pak na jelena evropského (*Cervus elaphus*), se zaměřením především na mikroorganismy podílející se na degradaci celulosy a tím přispět k rozšíření znalostí o fyziologii trávení volně žijících přežvýkavců. Pro tento účel jsme stanovili dvě základní hypotézy v práci uvedené a v průběhu řešení jsme směřovali k jejich potvrzení nebo vyvrácení. Jako hlavní metodický nástroj ke kvalitativnímu a kvantitativnímu popisu bakteriálního mikrobiomu a zejména organismů podílejících se na fermentaci celulosy jsme zvolili molekulárně genetické metody (DGGE, qPCR – Real-Time a NGS – next generation sequencing), stejnými metodami jsme výzkum rozšířili na sledování struktury mikrobiomu hub. Celou studii jsme směřovali především na hlavního představitele volně žijícího přežvýkavce na našem území, na jelena evropského (*Cervus elaphus*). Popsali jsme složení a strukturu jeho bachorové mikrobioty a souběžně jsme provedli porovnání s dalším důležitým představitelem volně žijících přežvýkavců s daňkem skvrnitým (*Dama dama*). Pro ověření hlavní hypotézy práce jsme bachorové mikrobiomy volně žijících přežvýkavců porovnávali se strukturou mikrobiomů obsažených v bachorech domácích přežvýkavců. V další části práce jsme se zaměřili na část mikrobioty podílející se na degradaci vlákniny, zejména mikroorganismy schopné degradovat celulosu. Podařilo se nám izolovat a identifikovat řadu bakteriálních kmenů s ověřenou celulolytickou aktivitou a některé z nich jsme detailněji popsali a tyto izoláty jsme deponovali do 2 evropských sbírek čistých kultur mikroorganismů. Rovněž jsme ověřili základní charakteristiky jejich celulolytických enzymů.

Molekulárně genetickými analýzami bylo zjištěno, že struktura bakteriálního mikrobiomu v bachorech jelena evropského je složena z dvou hlavních kmenů bakterií. Z kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Bylo prokázáno, že tyto bakterie zaujímají největší zastoupení v bakteriálním mikrobiomu cca 90 % z celkových bakterií. Dále bylo zjištěno, že se v mikrobiomu bachoru vyskytuje značné množství nekultivovaných druhů bakterií cca 45 %. Především se jednalo o bakterie náležející k řádu *Bacteroidales*, *Clostridiales*, čeledi *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae* a *Ruminococcaeae*. Nejvíce zastoupeným rodem bakterií byl rod *Prevotella*. Tyto výsledky byly podobné také ve všech molekulárně genetických analýzách ve vzorcích získaných od daňků, ovcí a turů. Struktura bakteriálního mikrobiomu je u všech zvířat podobná, ale rozdílné je zastoupení jednotlivých druhů bakterií. Tento závěr byl potvrzen indexy alfa diverzity s použitím Shannonova indexu, Simpsonova indexu a

indexů bohatosti (Richness) a rovnoměrnosti (Eveness), dále také indexy beta diverzity (Bray Curtis a Unifrac.) a principal coordinate analýzou PCoA. Obecně lze konstatovat, že složení mikrobiomu vykazuje vysoký stupeň diverzity populace. Podíl jednotlivých skupin se pak velmi liší. Bylo prokázáno, že u volně žijících přežvýkavců je vyšší zastoupení kmene *Firmicutes* než *Bacteroidetes*. U domácích přežvýkavců bylo vyšší zastoupení kmene *Bacteroidetes*. Tento jev byl pozorován u jelenů v oborním chovu, kde dominoval kmen *Bacteroidetes*, naproti tomu u jelenů ve volnosti dominoval kmen *Firmicutes*. Tento fakt byl prokazatelně způsoben racionalizací diety v oborních chovech jelenů a daňků, což je podobné jako u domácích přežvýkavců. S ohledem na zastoupení vlákniny v dietě přežvýkavců jsme značnou část práce věnovali studiu četnosti hlavních zástupců celulólytických bakterií druhů *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*. Kvantifikovali jsme jejich zastoupení neboli denzitu v bachorových obsazích i v exkrementech jak volně žijících jelenů, tak v oborních chovech a porovnávali je se vzorky získanými od ovcí a turů. Z výsledků vyplývá, že denzita celulólytických bakterií v exkrementech je prokazatelně nižší než v bachorových obsazích jelenů. Dále jsme došli k závěru, že jeleni žijící ve volné přírodě mají vyšší zastoupení druhu *Ruminococcus albus* než jeleni žijící v oborním chovu. V případě konfrontace celulólytických druhů s ostatními zvířaty, tak jsme došli k závěru, že jeleni mají vyšší zastoupení druhů *Fibrobacter succinogenes* a *Ruminococcus flavefaciens* než daňci, ovce a tuři.

Dále jsme studovali mikrobiom hub v bachoru jelenů, daňků, ovcí a turů. Zde jsme došli k závěru, že struktura hub v bachoru jednotlivých zvířat je podobná, ale liší se pouze v zastoupení jednotlivých druhů hub. Tento závěr byl potvrzen indexy alfa diverzity s použitím Shannonova indexu, Simpsonova indexu a indexů bohatosti (Richness) a rovnoměrnosti (Eveness), dále také indexy beta diverzity (Bray Curtis a Unifrac.) a principal coordinate analýzou PCoA. Rodem, který má největší zastoupení v mikrobiomu hub bachoru testovaných zvířat je rod *Orpinomyces*, který má největší zastoupení u daňků, což je 29,9 % z celkového počtu sekvencí. Tyto výsledky byly shrnuty a připraveny k publikaci.

V souladu s vytyčenou hypotézou jsme se pokusili porovnat celkovou celulasovou a xylanasovou enzymovou aktivitu a tak napomoci ověřit, zda jestli je bachorový mikrobiom aktivnější a efektivnější ve štěpení strukturních polysacharidů. Podrobili jsme obsahy bachorů z jelenů, daňků, ovcí a turů analýze extracelulární celulólytických a xylanolytických aktivit. Došli jsme k závěru, že bachorový mikrobiom volně žijících přežvýkavců je aktivnější a efektivnější, než u domácích přežvýkavců, i když se nepodařilo toto tvrzení podepřít statisticky významnými hodnotami.

Klasickými anaerobními technikami jsme z bacheru jelena evropského izolovali 47 čistých bakteriálních kultur s celulólytickými a xylanolytickými aktivitami, z nich bylo 6 izolátů označeno za nově objevené druhy bakterií. Kmen C10 byl vybrán a podroben dalším genotypovým, fenotypovým, metabolickým a proteomickým analýzám. Z výsledků bylo zjištěno, že kmen C10 *Actinomyces* sp. je blíže příbuzný druhům *Actinomyces glycerinitolerans* a *Actinomyces succiniciruminis*. Genové a fylogenetické analýzy potvrdili taxonomický rozdíl od druhu *Actinomyces ruminicola*, jako typového kmenu. Dále byly pozorovány velmi slabé rozdíly s druhy *Actinomyces glycerinitolerans* Am4t a *Actinomyces succiniciruminis* G10T. Tyto výsledky byly shrnuty a publikovány. Dále jsme izolovaný kmen C10 podrobili proteomickým analýzám (charakterizace a mapování proteinů). Z výsledků vyplývá, že tento kmen patří k aktinomycetám, jež nejsou běžně řazeny k celulólytickým mikroorganismům, je schopen produkovat do media značnou celulólytickou a xylanolytickou aktivitu. Významná aktivita byla také detekována v buněčné frakci kultury. Rovněž byly ověřeny optimální vlastnosti reakčního prostředí a celkový proteom byl vizualizován po izoelektrofokusaci 2D-ELFO PAGE metodou.

Naše výsledky naznačují, že dříve používané studie zaměřené především na domestikované druhy zvířat neobjasnily celou rozmanitost mikrobiomu v bacheru. Další a detailnější zkoumání bacherové mikrobioty u volně žijících přežvýkavců by potenciálně mohlo přinést řadu zcela nových poznatků o fyziologii a degradaci vlákniny v trávicím traktu přežvýkavců. To naznačuje i skutečnost, že jsme získali 6 čistých bakteriálních izolátů s celulólytickou aktivitou. Z výsledků dosažených molekulárně genetickými metodami vyplývá, že v bacherovém mikrobiomu obecně se vyskytuje řada dosud nepopsaných druhů bakterií. Je třeba se těmito druhy zabývat, ne pouze z hlediska mikrobiální ekologie založené na molekulárně genetických postupech, ale je důležité izolovat nové dosud nepopsané druhy bakterií klasickými kultivačními technikami a dále s těmito kmeny pracovat a analyzovat jejich fyziologické vlastnosti. Naznačili jsme tyto trendy provedením základních proteomických analýz. Další pokrok v mikrobiologii bude patrně především záviset na komplexních poznacích nejenom o struktuře a komplexnosti mikrobiálních populací, ale především na znalostech funkčních aktivit mikrobioty. Proto je potřeba studovat bakterie komplexně se všemi jejich vlastnostmi. Tyto poznatky jsou potom potenciálně využitelné v praktických např. biotechnologických aplikacích.

8. SEZNAM LITERATURY

Allen, A. (1981). Structure and function of gastrointestinal mucus. In: Johnson L.R. (ed.): Physiology of the gastrointestinal tract. Raven Press. New York. pp.617-619.

An, D., Cai, S., Dong, X. (2006). *Actinomyces ruminicola* sp. nov., isolated from cattle rumen. In Journal of Syst. Evol. Microbiol 56:2043-2048.

Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. New Biotechnology, vol. 25, is. 4, pp. 195 – 203.

Asano, S., Ikeda, S., Kasuya, N., Kurokawa, Y., Kanda, S., Itabashi, H. (2008). Comparative digestion of cell wall components of alfalfa hay cubes between Sika deer (*Cervus nippon*) and cattle. Animal Science Journal, 79, pp. 35 – 40.

Asano, S., Ikeda, S., Kurokawa, Y., Kanda, S., Itabashi, T. (2005). Comparison of digestibility, passage rate and rumen fermentation between sika deer (*Cervus nippon*) and cattle fed alfalfa hay cubes. Animal Sci J 76, pp. 447 – 451.

Bailey, R. W., MacRae, J. C. (1970). The hydrolysis by rumen and cecal microbial enzymes of hemicellulose in plant and digesta particles. J. Agr. Sci. 75. pp. 321.

Barbetta de Jesus, R., Omori, W. P., Gertrudes de Macedo Lemos, E., Marcondes de Souza, J. A. (2015). Bacteria diversity in bovine rumen by metagenomic 16S rDNA sequencing and scanning electron microscopy. Acta Scientiarum. Animal Sciences. vol. 37, no. 3.

Bartoš, S. (1987). Mikrobiologie a biochemie trávení v bachoru přežvýkavců. Praha: Academia, 187 s.

Bayer, A. E., Simon, W. J. L., Shoham, Y., Lamed, R. (1998). Cellulosomes – Structure and Ultrastructure. Journal of Structure Biology, 124, pp. 221 – 234.

Belanche, A., Erroa, I. R., Balcells, J., Calleja, L. (2010). Use of quantitative real-time PCR assesses the in vitro survival of specific DNA gene sequences of rumen microbes under simulated abomasal conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, pp. 204 – 211.

Bergvall, U. A. (2009). Development of feeding selectivity and consistency in food choice over 5 years in fallow deer. *Behavioural Processes*. No. 80. pp. 140-146.

Bernalier, A., Fonty, G., Bonnemoy, F., Gouet, P (1993). Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocalimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 139. pp. 873-880.

Bhat, M. K., Hazlewood, G. P., Bedford, M. R., Partridge, G. G. (2000) Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: *Enzymes in Farm Animal Nutrition* (Bedford, M. and Partridge, G., Eds.). pp. 11-60. CAB International, Wallingford.

Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. Vol. 8 (2). pp. 93 – 99.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Braun, U., Rihs, T., Schefer, U. (1992). Ruminal acidosis in sheep and goats. *The Veterinary Record*, vol. 130, pp. 343 - 349.

Bustin, S. A. (2000). *Journal of Molecular Endocrinology*. 25, pp. 169 – 193.

Cai, S., Li, J., Ze Hu, F., Zhang, K., Luo, Y., Janto, B., Boissy, R., Ehrlich, G., Dong, X. (2010). *Cellulosilyticum ruminicola*, a Newly Described Rumen Bacterium That Possesses Rudimentary Fibrolytic-Protein-Encoding Genes and Degrades Lignocellulose with Multiple Carbohydrate-Borne Fibrolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 12, pp. 3818 – 3824.

Caldwell, D. R., Bryant, M. P. (1966). Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14. pp. 794-801.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, K. E. (eds). (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7. pp. 335-336.

Carberry, C. A., Kenny, D. A., Han, S., McCabe, M. S., Waters, S. M. (2012). Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(14), pp. 4949 – 4958. doi: 10.1128/AEM.07759-11. pmid:22562991.

Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17:540-552.

Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal* 7(Supplements2), pp. 253 – 265. doi: 10.1017/s1751731113000852.

Claesson, M. J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., O'Toole, P. W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research*, doi: 10.1093/nar/gkq873.

Clauss, M., Flitz, J., Bayer, D., Nygren, K., Hamer, S., Hatt, J. M., Südekum, K. H., Hummel, J. (2009). Physical characteristics of rumen contents in four large ruminants of different feeding type, the addax (*Addax nasomaculatus*), bison (*Bison bison*), red deer (*Cervus elaphus*) and moose (*Alces alces*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 152, pp. 398 – 406.

Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1551-1558.

- Colman, J. E., Mysterud, A., Jorgensen, N. H., Moe, S. R. (2009). Active land use improves reindeer pastures: evidence from a patch choice experiment. *Journal of Zoology*, vol. 279, pp. 358 - 363.
- De Gregoris, B. T., Aldred, N., Clare, A. S., Burgess, J. G. (2011). Improvement of phylum and class specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J. Microbiol. Methods*. 86 (3). pp. 351-356.
- Deshpande, M. V., Eriksson, K. E., Pettersson, L. G. (1984): An assay for selective determination of exo-1,4,- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal Biochem*, 138: pp. 481 – 487.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M., Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS ONE*. 6:e280.
- Dunne, J. C., Kelly, W. J., Leahy, S. C., Bond, J. J., Attwood, G. T., Jordan, T. W. (2012). Extracellular polysaccharide-degrading proteome of *Butyrivibrio proteoplasticus*. *J Proteome Res*, 11 (1), pp. 131 – 142.
- Durantel, P., Cortay, Y G., Denuc, J., Deschryver, C., Rossignol, C. (2004). *Myslivošt. Havlíčkův Brod: Fragment*, 285 s., ISBN 80-7200894-3.
- Faichney, G. J. (1968). The production and absorption of volatile fatty acids from the rumen of sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 19. pp. 791-802.
- Fernando, S. C., Purvis, H. T., Najar, F. Z., Sukharnikov, L. O., Krehbiel, C. R., Nagaraja, T. G. (2010). Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 76. pp. 7482-7490.
- Finlay, B., Fenchel, T. (1992). An anaerobic ciliate as a natural chemostat for the growth of endosymbiotic methanogens. *European Journal of Protistology*, vol. 28, pp. 127 - 137.

Fliegerová, K., Tapio, I., Bonin, A., Mrazek, J., Callegari, M., Bani, P., Bayat, A., Vilkki, J., Kopečný, J., Shingfield, K.J., Boyer, F., Coissac, E., Taberlet, P., Wallace, R.J. (2014). Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population, *Anaerobe*, 29, 80-84. doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.015.

Flint, H. J. (1997). The rumen microbial ecosystem – some recent developments. *Trends in Microbiology*, vol. 5, pp. 483 - 488.

Flint, H. J., Aurilia, V., Kirby, J., Miyazaki, K., Rincon-Torres, M. T., McCrae, S. I., Martin, J. C. (1999). Organization of plant cell wall degrading enzymes in the ruminal anaerobic bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Prevotella bryantii*. In: Ohmiya, K., Hayashi, K., Sakka, K., Kobayashi, Y., Karita, S., Kimura, T. (eds.): *Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation*. Uni Publishers, Tokyo, pp. 511 – 519.

Flint, H. J., Zhang, J. X., Martin, J. (1994). Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Curr. Microbio*, 29, pp. 129 – 143.

Fonty, G., Jouany, J. P., Senaud, J., Gouet, P. h., Braun, J. (1984). The evolution of microflora and digestion in the rumen of lamb from birth to 4 months. *Canadian Journal of Animal Sciences*, vol. 64, Suppl., pp. 165 - 166.

Forsberg, C. W., Cheng, K. J., White, B. A. (1997). Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 1 (Mackie RI, White BA, Isaacson RE, eds.), pp. 319 - 379, Chapman a Hall, New York.

Fouts, D. E, Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R. C. et al. (2012). Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLoS One* 7: e48289.

Frey, J. C., Pell, A. N., Berthiaume, R., Lapierre, H., Lee, S., Ha, J. K., Mendell, J. E., Angert, E. R. (2009). Comparative studie sof microbial populations in the rumen duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cos. *Journal of Applied Mikrobiology*, 108, pp. 1982 – 1993.

Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol Lett. 205. pp. 31-36.

Gharechahi, J., Zahiri, H. S., Noghabi, K. A., Salekdeh, G. H. (2014). In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen. Systematic and Applied Microbiology. Vol. 38. pp. 67-76.

Gilbert, H. J., Hazlewood, G. P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. Journal of General Microbiology. Vol. 139. pp. 187-194.

Goris, J., Suzuki, K., DeVos, P., Nakase, T., Kersters, K. (1998). Evaluation of a microplate DNA - DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. Can. J. Microbiol 44:1148-1153.

Grüninger, R. J., Snesen, CH. W., McAllister, T. A., Foerster, R. J. (2014). Diversity of Rumen Bacteria in Canadian Cervids. PloS ONE 9 (2), e89682.

Guo, W., Li, Y., Wang, L., Wang, J., Xu, Q., Yan, T., Xue, B. (2015). Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology. Anaerobe. Vol. 34. pp. 74-79.

Guozeng, W., Huiying, L., Kun, M., Yaru, W., Huoqing, H., Pengjun, S., Xia, P., Peilong, Y., Qiyu, D., Hongfu, Z., Bin, Y. (2011). High Genetic Diversity and Different Distributions of Glycosyl Hydrolyse Family 10 and 11 Xylanases in the Goat Rumen. Plos ONE 6(2), vol. 6, issue 2, e16731.

Hammond, K. J., Hoskin, S. O., Jopson, N. B., Mackintosh, C. G., Hofstra, G., Thompson, B. R., Stevens, D. R. (2013). Gastrointestinal tract development in red deer (*Cervus elaphus*) calves from 1 to 12 months of age. Animal, 7:11, pp. 1816 – 1823.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M (1996). Real time quantitative PCR. Genome Research, vol. 6, no. 10, pp. 986 - 994.

Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonkder, A., Young, W. (eds) (2013). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found cross a wide geographical range. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/srep14567.

Hespell, R. B. (1981). Ruminant microorganisms: their significance and nutritional value. *Dev. Industr. Microbiol.* 22. 266.

Hespell, R. B., Akin, D. E., Dehority, B. A. (1997). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In: *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 1, Mackie R. I. and White B. A., eds., New York: Chapman and Hall, pp. 319 - 380.

Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T., Chokhawala, H. (eds). (2011). Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading genes and Genomes from Cow Rumen. *Science*. Vol. 331.

Hintnaus, J. (2010). Racionální přikrmování jelení zvěře. *Myslivost*, no. 12, s. 24 - 26.

Hintnaus, J. (2011). Sezónní výživa srnčí a jelení zvěře. *Myslivost*, no. 2, s. 28 – 32.

Ho, Y. W., Barr, D. J. S., Abudullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H. (1993). A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia. *Mycotaxon*, vol. 47, pp. 285 – 293.

Hobson, P. N., Stewart, C. S. (1997). *The rumen microbial ecosystem*. Blackie academic and professional publishers, London.

Hofmann, R. R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78, pp. 443 - 457.

Hong, J., Tamaki, H., Akiba, S., Yamamoto, K., Kumagai, H. (2001). Cloning of a gene encoding a highly stable endo-b-1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. *J. Biosci. Bioeng.* 92:434-441.

Hu, X., Liu, G., Shafer, A. B. A., Wei, Y., Zhou, J., Lin, S., Wu, H., Zhou, M., Hu, D., Liu, S. (2017). Comparative Analysis of the Gut Microbial Communities in Forest and Alpine Musk Deer Using High-Throughput Sequencing. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 8. Article 572.

Hume, I. D., Warner, A. C. I. (1980). Evolution of microbial digestion in mammals. In: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Ruckebusch Y., Thivend P., eds., Lancaster: MTP press Ltd., pp. 617.

Hungate, R. E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriological Review, vol. 14, s. 1.

Hungate, R. E. (1966). The rumen and its microbes. New York: Academic press, 533 s.

Hungate, R. E. (1976). Microbial activities related to mammalian digestion and absorption of food. In: Spiller GA, Amen R. J. (eds.): Fiber in human nutrition. Plenum Press, New York, pp. 131 - 149.

Cheng, K. J., Costerton, J. W. (1980). Adhesive bacteria – their role in digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: Ruckebusch, Y., Thivend, P. (eds.): Digestive physiology and metabolism in ruminants. MTP Press, Lancaster, pp. 225 – 250.

Ibrahim, E. A., Ingalls, J. R. (1972). Microbial protein biosynthesis in the rumen. J. Dairy Sci. 55. pp. 971-978.

Ichmura, Y., Yamano, H., Takano, T., Koike, S., Kobayashi, Y., Tahala, T., Ozaki, N., Suzuki, M., Okada, H., Yamanaka, M. (2004). Rumen microbes and fermentation of wild sika deer on the Shiretoko peninsula of Hokkaido Island, Japan. Ecological Research 19, pp. 389 – 395.

Ishaq, S. L., Wright, A. D. G. (2014). Design and validation of four new primers for next-generation sequencing to target the 18S rRNA genes of gastrointestinal ciliate protozoa. Appl Environ Microbiol, 80(17), pp. 5515 – 5521. doi: 10.1128/AEM.01644-14. pmid:24973070.

Jami, E., Mizrahi, I. (2015). Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. PLoS ONE, 7 (3), e33306.

Jelínek, R. (2007). Škody zvěří, část II.: Předcházení škod na zemědělských plodinách a lesních porostech, Myslivost, no. 3, s. 5 - 8.

Jeon, S. D., Yu, K. O., Kim, S. W., Han, S. O. (2011). A cellulolytic complex from *Clostridium cellulovorans* consisting of mannanase B and endoglucanase E has synergistic effects on galactomannan degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer, 90, pp. 565 – 572.

Jouany, J. P. (2006). Rumen ciliate protozoa: their multiple roles in the digestive tract of ruminants. *Endocytobiosis Cell Research*, vol. 17, pp. 93 - 102.

Jouany, J. P., Demeyer, D. I., Braun, J. (1988). Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science Technology*, vol. 21, pp. 229 - 265.

Jun, H. S., Qi, M., Ha, J. K., Forsberg, C. W. (2007). *Fibrobacter succinogenes*, a dominant fibrolytic ruminal bacterium: transition to the post genomic era. *Asian-Austral J Anim Sci* 20, pp. 802 - 810.

Jünemann, S., Prior, K., Szczepanowski, R., Harks, I., Ehmke, B., Goesmann, A., Stoye, J., Harmsen, D. (2012). Bacterial Community Shift in Treated Periodontitis Patients Revealed by Ion Torrent 16S rRNA Gene Amplification Sequencing. *PLoS ONE*, 7 (8), e41606.

Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Sci* 89 (1), pp. 124 - 135.

Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K. (1997). Cellulosomes and cellulase complexes of anaerobic microbes: their structure, models and function. In: Onodera, R., Itabashi, H., Karnchanat, A., Petsom, A., Sanvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A. J., Reynolds, C. D., Sihanonth, P. (2007). Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol. Lett.* 270. pp. 162 - 170.

Kay, R. N. B. (1960). The rate of flow and composition of various salivary secretion in sheep and calves. *Journal of Physiology*, vol. 150, pp. 515 - 537.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A.

(2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Khejornsart, P., Wanapat, M., Rowlinson, R. (2011). Diversity of buffalo fungi and rumen fermentation characteristic in swamp buffalo and beef cattle fed on different diets. *Livestock Sci* 139, pp. 230 - 236.

Killer, J., Havlík, J., Bunešová, V., Vlková, E., Benada, O. (2014). *Pseudoscardovia radai* sp. nov., another representative of a new genus within the family Bifidobacteriaceae isolated from the digestive tract of a wild pig (*Sus scrofa scrofa*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:2932-2938.

Killer, J., Kopečný, 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. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:359-366.

Killer, J., Ročková, Š., Vlková, E., Rada, V., Havlík, J., Kopečný, J., Bunešová, V., Benada, O., Kofroňová, O., Pechar, R., Profousová, I. (2013). *Alloscardovia macacae* sp. nov., isolated from the milk of a macaque (*Macaca mulatta*), emended description of the genus *Alloscardovia* and proposal of *Alloscardovia criceti* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:4439-4446.

King, c., Scott-Horton, T. (2008). Pyrosequencing a simple Method for accurate genotyping. *Methods Molecular Biology*, 373, pp. 39 – 56.

Kirby, J., Martin, J., Daniel, A., Flint, H. J. (1997). Dockerin-like sequences in cellulases and xylanases from the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett*, 149, pp. 213 – 219.

Kittelmann, S., Janssen, P. H. (2011). Characterization of rumen ciliate community composition in domestic Wheel, deer and cattle, Fediny on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. *FEMS Microbial Ecology*, 75, pp. 468 – 481.

Kittlmann, S., Naylor, G. E., Koolaard, J. P., Janssen, P. H. (2012). A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class *Neocallimastigomycetes*) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. *PLoS One*, 7 (5), e36866.

Kittlmann, S., Patino-Pinares, C. S., Seedorf, H., Kirk, M. R., Ganesh, S., McEwan, J. C., Janssen, P. H. (2014). Two Different Bacterial Community Types Are Linked with the Low-Methane Emission Trait in Sheep. *PLoS ONE* 9(7): e103171.

Kittlmann, S., Seedorf, H., Walters, W. A., Clemente, J. C., Knight, R., Gordon, J. I., et al. (2013). Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS One*, 8(2), e47879. doi: 10.1371/journal.pone.0047879. pmid:23408926.

Klieve, A. V., Hudman, J. F., Bauchop, T. (1989). Inducible bacteriophages from ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (6). pp.1630-1634.

Klieve, A.V. and Bauchop, T. (1988). Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 54. pp. 1637-1641.

Kobayashi, Y., Foerster, J. F., Teather, M. R. (2000). Development of a competitive polymerase chain reaction assay for the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156 and its use for tracking an OB156 – derived recombinant. *FEMS Microbiology Letters*, 188, pp. 185 – 190.

Kobayashi, Y., Shinkai, T., Koike, S. (2008). Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion – review. *Folia Microbiol* 53 (3), pp. 195 - 200.

Kocherginskaya, S. A., Aminov, R. I., White, B. A. (2001). Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using DGGE, random sequencing and statistical ecology approaches. *Anaerobe* 7, pp. 119 - 134.

Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S., Kobayashi, Y. (2010). Molecular monitoring and isolation of previously uncultured bacterial strains from the rumen sheep. *Appl Environ Microbiol* 76 (6), pp. 1887 - 1894.

Koike, S., Kobayashi, Y. (2001). Development and use of competitive PCR assay for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 204. pp. 361 - 366.

Koike, S., Yabuki, H., Kobayashi, Y. (2007). Validation and application of real-time polymerase chain reaction assays for representative rumen bacteria. *Anim Sci J* 78, pp. 135 - 141.

Kong, F., Zhao, J., Han, S., Zeng, B., Yang, J., Si, X., Yang, B., Yang, M., Xu, H., Li, Y. (2014). Characterization of the Gut Microbiota in the Red Panda (*Ailurus fulgens*). *PLoS ONE*, 9 (2), e87885.

Kong, Y., Teather, R., Forster, R. (2010). Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forage. *FEMS Microbiology Ecology* 74 (3). pp. 612-622.

Krause, D. O., Russell, J. B. (1996). How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Sciences*, vol. 79, pp. 1467 - 1475.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 33. pp. 1870-1874.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. Vol. 227.

Latham, M. J., Wolin, M. J. (1977). Fermentation of cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the presence and absence of *Methanobacterium ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 34. pp. 297 - 301.

Leng, J., Zhong, X., Zhu, R. J., Yang, S. L., Gou, X., Mao, H. M. (2011). Assessment of protozoa in Yunnan yellow cattle rumen based on the 18S r RNA sequences. *Molecular Biology Rep.*, vol. 38, pp. 577 - 585.

Lever, M. (1977). Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazided (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry* 81, pp. 21 – 27.

Lewett, P. N. (1978). *Anaerobic Microbiology – a Practical Approach*. Oxford University Press. Oxford. 303.

Li, Z. P., Liu, H. L., Li, G. Y., Bao, K., Wang, K. Y., Xu, C., et al. (2013). Molecular diversity of rumen bacterial communities from tannin-rich and fiber-rich forage fed domestic Sika deer (*Cervus nippon*) in China. *BMC Microbiol*, 13(1), 151. doi: 10.1186/1471-2180-13.

Li, Z. P., Wright, A. D. G., Liu, H. L., Bao, K., Zhang, T. T., Wang, K. Y., et al. (2015a). Bacterial community composition and fermentation patterns in the rumen of sika deer (*Cervus nippon*) fed three different diets. *Microb Ecol.*, 69(2), pp. 307 – 318. doi: 10.1007/s00248-014-0497-z. pmid:25252928.

Li, Z., Wright, A. D. G., Fan, Z., Yang, F., Zhang, Z., Li, G. (2015b). Response of the Rumen Microbiota of Sika Deer (*Cervus nippon*) Fed Different Concentrations of Tannin Rich Plants. *Plos One* 10 (5), e0123481.

Li, Z., Zhang, Z., Xu, Ch., Zhao, J., Liu, H., Fan, Z., Yang, F., Wright, A. G., Li, G. (2014). Bacteria and Methanogens Differ along the Gastrointestinal Tract of Chinese Roe Deer (*Capreolus pygargus*). *PLoS ONE* 9(12): e114513.

Lochman, J., Hanzal, V., Lošťák, B., Pavlík, P., Rys, J., Studnička, E., Zúmr, J. (1985). *Jelení zvěř*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 352 s., DT 639.1

Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K. H., Wagner, M. (2002). Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68. pp. 5064-5081.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002). Microbial Celulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular biology Reviews*, pp. 506 – 577.

Mackie, R. I. (2002). Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *International Comparative Biology*, vol. 42, pp. 319 - 326.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor NY.

Mann, S. O., Ørskov, E. R. (1973). The effect of rumen and post-rumen feeding of carbohydrates on the caecal microflora of sheep. *J. Appl. Bacteriol.* 36. pp. 475-484.

Mardis, E. R. (2008). Next generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomidx Hum Genet*, 9, pp. 387 – 402.

McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., Cheng, K. J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72, pp. 3004 – 3018.

Metzker, J. (2010). Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11, pp. 31 – 46.

Min, B. R., Solaiman, S., Shange, R., Eun, J. S. (2014). Gastrointestinal bacterial and methanogenic archaea diversity dynamics associated with condensed tannin-containing pine bark diet in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. *International Journal of Microbiology*, 11, doi: 10.1155/2014/141909.

Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M. (2001). Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *Journal of Dairy Science*, vol. 84, no. 6, pp. 1294 – 1309.

Miron, J., Yokoyama, M. T., Lamed, R. (1989). Bacterial cell surface structures involved in lucerne cell wall degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria, *Appl. Microbiol Biotechnol* 32, pp. 218 - 222.

- Moon, Y. H., Ok, J. U., Lee, S. J., Ha, J. K., Lee, S. S. (2010). A comparative study on the rumen microbial populations, hydrolytic enzyme activities and dry matter degradability between different species of ruminant. *Animal Science Journal*, 81, pp. 642 – 647.
- Morrison, M., Miron, J. (2000). Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins. *FEMS Microbiol Lett* 185, pp. 109 - 115.
- Mountfort, D. O., Asher, R. A. (1989). Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocalimastix frontalis*. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 55, pp. 1016 - 1022.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, pp. 695 – 700.
- Myer, P. R., Smith, T. P. L., Wells, J. E., Kuehn, L. A., Freetly, H. C. (2015). Rumen Microbiome from Steers Differing in Feed Efficiency. *PLoS ONE*, 10 (6), e0129174.
- Myers, L. L., Jackson, H. D. Packett, L. V. (1967). Absorption of volatile fatty acids from the cecum of sheep. *J. Anim. Sci.* 26. pp. 1450-1458.
- Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., Maniatis, T (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clump can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, vol. 13, no. 9, pp. 3131 - 3145.
- Nagpal, R., Puniya, A. K., Sehgal, J. P., Singh, K. (2011). In vitro fibrolytic potential of aerobic rumen fungi from ruminants and non-ruminant herbivores. *Mycoscience*. 52: pp. 31-38.
- Nicholson, M. J., McSweeney, Ch. S., Mackie, R. I., Brookman, J. L., Theodorou, M. K. (2010). *Anaerobe*. Vol. 16. pp. 66-73.
- Novotná, Z., Procházka, J., Šimůnek, J. Fliegerová, K. (2010). Xylanases of Anaerobic Fungus *Anaeromyces mucronatus*. *Folia Microbiol* 55 (4), s. 363 – 367.

Nyonyo, T., Shinkai, T., Mitsumori, M. (2014). Improved culturability of cellulolytic rumen bacteria and phylogenetic diversity of culturable cellulolytic and xylanolytic bacteria newly isolated from the bovine rumen. *FEMS Microbiol Ecol* 88, pp. 528 – 537.

Ogimoto, K., Imai, S. (1981): Atlas of rumen microbiology. Japan Sci. Soc. Press. Tokio.

Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (2000). Characterization of cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, pp. 254 – 260.

Orpin, C. G., Joblin, K. N. (1997). The rumen anaerobic fungi. In: Hobson, P. N., Stewart, C. S. (eds.): The rumen microbial ecosystem, Blackie academic and professional publishers, London, pp. 140 – 195.

Ozkose, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith G. W., Theodorou, M. K. (2001). *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Can J Bot* 79, pp. 666 – 673.

Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Itabashi, H. (2005). The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Biosci. Biotechnol, Biochem.* 69, pp. 499 – 506.

Palakawong, N. A. S., Hornung, B., Ravikumar Varadarajan, A., Plugge, W., Plugge, C. M. (2017). Draft Genome Sequence of *Actinomyces succiniciruminis* Strain Am4T, Isolated from Cow Rumen Fluid. *Genome Announc.* 5(29). pii: e01587-16.

Palakawong, N. A. S., Pristaš, P., Hrehová, L., Javorský, P., Stams, A. J. M., Plugge, C. M. (2017). *Actinomyces succiniciruminis* sp. nov. and *Actinomyces glycerinitolerans* sp. nov., two novel organic acid-producing bacteria isolated from rumen. *Syst. Appl. Microbiol.* 39: 445-452.

Pope, P. B., Mackenzie, A. K., Gregor, I., Smith, W., Sundset, M. A. et al. (2012). Metagenomics of the Svalbard reindeer rumen microbiome reveals abundance of polysaccharide utilization loci. *PLoS One* 7: e38571.

Prigge, E. C., Stuthers, B. A., Jacquement, N. A. (1990). Influence of forage diets on ruminal particle size, passage of digesta, feed intake and digestibility by steers. *J. Anim. Sci.* 68: pp. 4352 – 4360.

Qian, W., Li, Z., Ao, W., Zhao, G., Li, G., Wu, J. (2017). Bacterial community composition and fermentation in the rumen of Xinjiang brown cattle (*Bos taurus*), Tarim red deer (*Cervus elephus yarkandensis*), and Karakul sheep (*Ovis aries*). *Canadian Journal of Microbiology*. 10.1139/cjm-2016-0596.

Reddy, S. K. K., Morrison, M. (1998). Biochemical and molecular characterization of adherence-defective mutants of *Ruminococcus albus* strain 8. In Proc. MIE bioforum on cellulose degradation, Institut Pasteur, Paris, pp. 132.

Russell, J. B., Nespekl, R. B. (1981). Microbial rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, vol. 64, pp. 1153 - 1169.

Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., Morgavi, D. P. (2007). PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *The Animal Consortium*, 1-7, pp. 939 – 944.

Saha, B. C., Bothast, R. J. (1996). Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3165-3170.

Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., Yadav, A. (2015). Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme. Res:*279381.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 312.

Samsudin, A. A., Evans, P. N., Wright, A. D. G., Jassim, R. (2011). Molecular diversity of the foregut bacteria community in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Environ. Microbiol.* Vol. 13. pp. 3024-3035.

Sawanon, S., Koike, S., Kobayashi, Y. (2011). Evidence for the possible involvement of *Selenomonas ruminantium* in rumen fiber digestion. FEMS Microbiology Letter, 325, pp. 170 – 179.

Seo, J. K., Park, T. S., Kwon, I. H., Piao, M. Y., Lee, C. H., Ha, J. K. (2013). Characterization of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 Isolated from the Rumen of a Native Korean Goat. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol. 26. No. 1. pp. 50-58.

Shanks, O. C., Kelty, C. A., Archibeque, S., Jenkins, M., Newton, R. J., McLellan, S. L. (2011). Community structures of rumen bacteria in cattle from different animal feeding operations. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 77. pp. 2992-3001.

Shinkai, T., Matsumoto, N., Kobayashi, Y. (2007a). Ecological characterization of three different phylogenetic groups belonging to the cellulolytic bacterial species *Fibrobacter succinogenes* in the rumen. Anim Sci J 78, pp. 503 – 511.

Shinkai, T., Ueki, T., Kobayashi, Y. (2010). Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. Anim Sci J 81, pp. 72 – 79.

Shinkai, T., Kobayashi, Y. (2007b). Localization of Ruminant Cellulolytic Bacteria on Plant Fibrous Materials as Determined by Fluorescence In Situ Hybridization and Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, no. 5, pp. 1646 – 1652.

Shinkai, T., Ohji, R., Matsumoto, N., Kobayashi, Y. (2009). Fibrolytic capabilities of ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* in relation to its phylogenetic grouping. FEMS Microbiol Lett 294, pp. 183 – 190).

Shoham, Y., Lamed, R., Bayer, E. A. (1999). The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. Trends Microbiol 7, pp. 275 – 281.

Shokralla, S., Spall, J. L., Gibbon, J. F., Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21, pp. 1794 – 1805.

Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A. (2010): A Windows into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*. vol. 19, is. 2, pp. 227 – 240.

Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., et al. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun.*, 5,doi: 10.1038/ncomms4654.

Sirohi, S. K., Singh, N., Dagar, S. S., Puniya, A. K. (2012). Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 95. pp. 1135 – 1154.

Skillman, L. C., Toovey, A. F., Williams, A. J., Wright, A. D. G. (2006). Development and Validation of a Real-Time PCR Method To Quantify Rumen Protozoa and Examination of Variability between *Entodinium Populations* in Wheel Offered a Hay-Based Diet. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 1, pp. 200 – 206.

Stern, J., Kahn, A., Vazana, Y., Shamshoum, M., Morais, S., Lamed, R., Bayer, E. A. (2015). Significance of Relative Position of Cellulases in Designer Cellulosomes for Optimized Cellulolysis. *PLoS ONE*, 10 (5), E0127326.

Stevens, C. E., Hume, I. D. (1995). *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*, 2nd ed, Cambridge University Press.

Stewart, C. S. (1997). Microorganisms in hindgut fermentors. In: *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 2, Mackie R. I. and White B. A., eds., New York: Chapman and Hall, pp. 142-186.

Stewart, C. S., Flint, H. J., Bryant, M. P. (1997). The rumen bacteria. In: Hobson, P. N., Stewart, C. S. (eds.): *The rumen microbial ecosystem*. Blackie academic and professional publishers, London, pp. 10 – 72.

Suen, G., Weimer, P. J., Stevenson, D. M., Aylward F. O., Boyum, J. (eds) (2011). The Complete Genome Sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a Cellulolytic and Metabolic Specialist. PLoS ONE, 6 (4), e18814.

Sullivan, A., Edlund, c., Nord, C. E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. Lancet Infect. Dis. 1. pp. 101-114.

Sun, X. Z., Joblin, K. N., Andrew, I. G., Hoskin, S. O., Harris, P. J. (2008). Degradation of forage chicory by ruminal fibrolytic bacteria. Journal of Applied Microbiology, 105, pp. 1286 – 1297.

Sundset, M. A., Barbora, P. S., Green, T. K., Folkow, L. P., Blix, A. S., Mathiesen, S. D. (2010). Microbial degradation of usnic acid in the reindeer rumen. Naturwissenschaften, vol. 97, pp. 273 - 278.

Sundset, M. A., Edwards, J. E., Cheng, Y. F., Senosiain, R. S., Fraile, M. N., Northwood, K. S., Praesteng, K. E., Glad, T., Mathiesen, S. D., Wright, A. D. (2009). Rumen microbial diversity in Svalbard reindeer, with particular emphasis on methanogenic archaea. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 70, Issue 3. pp. 553-562.

Sundset, M. A., Praesteng, K. E., Cann, I. K. O., Mathiesen, S. D., Mackie, R. I. (2007). Novel Rumen Bacterial Diversity in Two Geographically Separated Sub-Species of Reindeer. Microbial Ecology. Vol. 54. pp. 424-438.

Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y. (2001). Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67. No. 6. pp. 2766-2774.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution. Vol. 30. pp. 2725-2729.

Tanentzap, A. J., Bee, J. N., Lee, W. G., Lavers, R. B., Mills, J. A., Mark, A. F., Coomes, D. A. (2009). The reliability of palatability estimates obtained from rumen contents analysis and a field-based index of diet selection. *Journal of Zoology*, 278, pp. 243 – 248.

Teunissen, M. J., De Kort, G. V. M., Op De Camp, H. J. M., Vogels, G. D. (1993). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of anaerobic fungi from ruminant and nonruminant herbivores on different substrates. *Appl Biochem Biotechnol* 39/40, pp. 177 – 189.

Theodorou, M. K., Mennim, G., Davies, D. R., Zhu, W. Y., Rickers, A., Nielsen, B. B., Gull, K., Trinci, A. P. (1996). Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 55, no. 3, pp. 913 - 926.

Tichopad, A., Digger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M. W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, 31 (22), 6688.

Ulyatt, M. J., Dellow, D. W., Reid, C. S. W., Bauchop, T. (1975). Structure and function of the large intestine of ruminants. In: McDonald I.W., Warner A.C.I. (eds.): *Digestion and metabolism in the ruminant*. University of New England Printing Unit. Armidale. Australia. pp. 119-133.

Veselý, Z., Chloupková, V., Jagoš, P., Jakobe, P., Jambor, V., Kolář, I., Lakota, V., Ochodnický, D., Piskač, A., Šimeček, K., Špaček, F. (1984). *Výživa a krmění hospodářských zvířat*, Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 360 s., DT 636-084.

Větrovský, T., Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE*. 8(2): e57923.

Waite, D. W., Taylor, M. W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Front. Microbiol.* Vol. 5. pp. 223

Wallace, R. J., Broderick G. A., Brammall, M. L. (1986). Protein degradation by ruminal microorganisms from sheep fed dietary supplements of urea, casein or albumin. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 53, pp. 751-753.

Wanapat, M., Pilajun, R., Kongmun, P. (2009). Ruminal ecology of swamp buffalo as influenced by dietary sources. *Animal Feed Science Technology*, vol. 151, pp. 205 - 214.

Wasielewska, M., Banel, A., Zygmunt, B. (2014). Capillary electrophoresis in determination of low molecular mass organic acids. *Int. J. Environ. Sci. Develop* 5:417-425.

Williams, A. G., Coleman, G. S. (1985). Hemicellulose degrading enzymes in rumen ciliate protozoa. *Current Microbiology*, vol. 12, pp. 85 - 90.

Williams, A. G., Coleman, G. S. (1997). The rumen protozoa. In: Hobson, P. N., Stewart, C. S. (eds.): *The rumen microbial ecosystem*. Blackie academic and professional publishers, London, pp. 73 – 139.

Williams, A. G., Withers, S. E., Orpin, C. G. (1994). Effect of the carbohydrate growth substrate on polysaccharolytic enzyme formation by anaerobic fungi isolated from the foregut and hindgut of nonruminant herbivores and the forestomach of ruminants. *Lett Appl Microbiol* 18, pp. 147 – 151.

Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14, pp. 253 – 263.

Wolin, M. J.(1981). Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science* 213. pp. 1463-1468.

Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, pp. 75 – 85.

Yung-Chung, Lo., Ganesh, D., Saratale, Wen-Ming, Chen., Ming-Der, Bai., Jo-Shu, Chang. (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology* 44, pp. 417 – 425.

Zabloudil, F., Vala, Z. (2008). Srnčí zvěř a její životní potřeby v současnosti. *Myslivost* 2008 (3), pp. 50-53.

Zebeli, Q., Dijkstra, J., Tafaj, M., Steingass, H., Ametaj, B. N., Drochner, W. (2008). Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the response of luminal pH and milk fat production to composition of the diet. *J. Dairy Sci.* Vol. 91. pp. 2046 - 2066.

Zielinska, S., Kidawa, D., Stempniewicz, L., Los, M., Los, J. M. (2016). New Insights into the Microbiota of the Svalbard Reindeer Rangifer *Tarandus platarhynchus*. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7. Article 170.

Zimmermann, W., Winter, B., Broda, P. (1988). Xylanolytic enzyme activities produced by mesophilic and thermophilic actinomycetes grown on graminaceous xylan and lignocellulose. *FEMS Microbiol Lett* 55:181-185.

Zverlov, V., Kellermann, J., Schwarz, W. H. (2005). Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics* 5, pp. 3646 – 3653.