

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra ochrany lesa a myslivosti



**STRUKTURA MIKROBIÁLNÍHO EKOSYSTÉMU
TRÁVICÍHO TRAKTU JELENA LESNÍHO
(*CERVUS ELAPHUS*)
CHOVANÉHO V OBORNÍM CHOVU A VE VOLNOSTI**

Diplomová práce

Bc. Jiří Šimůnek

Obor: LES

Vedoucí práce: Ing. Petra Nováková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Jan Kopečný, DrSc.

Praha 2011

Česká zemědělská univerzita v Praze
Katedra ochrany lesa a myslivosti

Fakulta lesnická a dřevařská
Akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

pro: Bc. Jiřího Šimůnka
obor: Lesní inženýrství

Název tématu: Struktura mikrobiálního ekosystému trávicího traktu jelena lesního (*Cervus elaphus*) chovaného v oborním chovu a ve volnosti

Název tématu v anglickém jazyce: Microbial ecosystem structure of the red deer (*Cervus elaphus*) digestive system breded in game preserves and in free scope

Zásady pro vypracování:

1. Úvod a cíl práce
2. Rozbor literatury
3. Materiál a metodika
4. Výsledky a diskuse
5. Závěr
6. Seznam použité literatury
7. Přílohy

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah průvodní zprávy: cca 50-70 stran

Seznam odborné literatury:

Prins R. A., Geelen M. J. H., 1971: Rumen Characteristics of Red Deer, Fallow Deer, and Roe Deer. The Journal of Wildlife Management, Vol. 35, No. 4. pp. 673-680
Časopis Myslivost/Stráž myslivosti, vydavatel Myslivost s.r.o.
Svět myslivosti, vydavatel Lesnická práce s.r.o.
Folia Venatoria, vydavatel Lesmedium Bratislava
Lynx, vydavatel Národní muzeum Praha

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petra Nováková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Jan Kopečný, DrSc.

Datum zadání diplomové práce: 25.2.2010

Termín odevzdání diplomové práce: 30.4.2011

J. Kopečný

Vedoucí katedry



Adela K.

Děkan

V Praze dne *25.2.2010*

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Struktura mikrobiálního ekosystému trávicího traktu jelena lesního (*Cervus elaphus*) chovaného v oborním chovu a ve volnosti“ vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a pokynů vedoucího.

V Praze dne 25. 4. 2011

.....

Bc. Jiří Šimůnek

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Ing. Janu Kopečnému, DrSc. a Ing. Ingrid Koppové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a laskavý přístup a za umožnění vypracování této diplomové práce na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR.

Dále děkuji své vedoucí diplomové práce Ing. Petře Novákové. A neposlední řadě děkuji svým rodičům za podporu během studia.

ABSTRACT

Jelen evropský je schopen trávit nerozpustné polysacharidy pomocí symbiotických mikroorganismů kolonizující jeho trávicí trakt: bakterií, prvoků a anaerobních hub.

V této práci jsme pomocí molekulárně genetických metod (denaturační gradientové gelové elektrofozéra DGGE, polymerázové řetězové reakce PCR) sledovali složení mikrobiální populace bachoru a exkrementů jelena evropského chovaného ve volnosti a v oborním chovu. Typické skupiny mikroorganismů jsme kvantifikovali pomocí metody PCR RealTime. Příbuznost detekovaných mikroorganismů byla ověřena pomocí metody fylogenetických stromů.

DGGE profily ukázaly vysoký stupeň diverzity mikrobiální populace každého subjektu. Sekvenační analýza odhalila, že většina sekvencí byla přiřazena k nekultivovaným a nekultivovaným bachorovým bakteriím. Dále byly detekovány sekvence odpovídající rodům *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Pseudomonas* a *Eubacterium*.

Výsledky metody PCR RealTime prokázaly v bachorovém obsahu jelenů z volně žijící populace vyšší počty skupiny klostridií a bakteroides. V počtech celkových bakterií, skupiny desulfiovibrií, enterobakterií a bifidobakterií nebyly nalezeny významné rozdíly. Ve vzorcích exkrementů z oborního chovu byly detekovány vyšší počty celkových bakterií, klostridií a významně vyšší počty u skupiny aspergila a enterobakterií.

Klíčová slova: jelen, bachor, mikroflóra, DGGE, qPCR

ABSTRACT

Red Deer is able to digest insoluble polysaccharides with symbiotic micro-organisms colonizing the digestive tract: mostly bacteria, protozoa and anaerobic fungi. In the presented work we described the composition of microbial population of the rumen and feces of farmed red deer and red deer kept in the wild by using of molecular genetic techniques (denaturing gradient gel electrophoresis DGGE, polymerase chain reaction PCR). Typical groups of microorganisms were quantified by RealTime PCR. The phylogenic affinity of detected microorganisms was verified by the method of phylogeny trees.

DGGE profiles revealed a high degree of diversity of microbial populations of each subject. That most sequenced samples were assigned to the uncultivated and uncultivated ruminal bacteria. Other detected sequences were corresponding to the genera *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Pseudomonas* and *Eubacterium*. RealTime PCR results shown in ruminal contents from wild deer population increased numbers of bacteria belonging to group of *Clostridia* and *Bacteroides*. The numbers of total bacteria, *Desulfovibrio*, *Bifidobacteria* and *Enterobacteria* groups were not found significant different. In the samples of excrement from deer park were found higher numbers of total bacteria, *Clostridia* group, and significantly higher numbers of *Aspergillus* and *Enterobacteriaceae* were detected.

Key words: deer, rumen, microbiota, DGGE, qPCR

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. CÍL PRÁCE	12
3. ROZBOR LITERATURY	13
3.1 Trávicí ústrojí jelení zvěře	13
3.1.1 Anatomie trávicího ústrojí	14
3.1.2 Fyziologie předžaludků a žaludku	17
3.1.3 Strategie přežvýkavců při využívání krmiv	17
3.1.4 Bachorový mikrobiální ekosystém	18
3.2 Výživa jelení zvěře	28
3.2.1 Složení potravy jelení zvěře	30
3.2.2 Význam struktury a složení krmiv pro jelení zvěř	33
4. MATERIÁL A METODIKA	35
4.1 Materiál	35
4.1.1 Komerční kity	35
4.1.2 PCR primery	35
4.1.3 Roztoky pro práci s DNA	36
4.1.4 Použité přístroje	37
4.2 Odběr vzorků a zpracování vzorků	37
4.2.1 Charakteristika lokality volného chovu jelenů v oblasti Strážného	39
4.2.2 Charakteristika lokality oborního chovu jelenů v oboře Aglája u Dobříše	40
4.3 Izolace DNA	40
4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) – Amplifikace úseku 16S rDNA	40
4.5 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	41
4.6 Sekvenování	43
4.7 Příprava agarózového gelu a podmínky elektroforézy	44
4.8 Konstrukce fylogenetického stromu	45
4.9 Real-time PCR	45
4.9.1 Seznam teplotních profilů pro qPCR	46
4.9.2 Statistické zhodnocení	48
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	49

5.1 Charakteristika mikroorganismů v trávicím traktu.....	49
5.1.1 Bakteriální druhy u jelenů z divokého chovu ze vzorků z bacheru.....	50
5.1.2 Bakteriální druhy u jelenů z divokého chovu ze vzorků ze stolice	57
5.1.3 Bakteriální druhy u jelenů z oborního chovu ze vzorků z bacheru	61
5.1.4 Bakteriální druhy u jelenů z oborního chovu ze vzorků ze stolice.....	66
5.1.5 Kontrola čistoty vyřezaných fragmentů.....	71
5.2 Konstrukce fylogenetického stromu	74
5.3 Počty jednotlivých mikroorganismů osidlující trávicí trakt	76
5.3.1 Celkové bakterie	77
5.3.2 <i>Bacteroides</i>	77
5.3.3 <i>Clostridium</i>	78
5.3.4 <i>Desulfovibrio</i>	79
5.3.5 <i>Aspergillus</i>	80
5.3.6 <i>Escherichia</i>	81
5.3.7 <i>Bifidobacterium</i>	82
6. ZÁVĚR	84
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86

1. ÚVOD

Jelen evropský je tradiční a také největší zástupce spárkaté zvěře obhospodařované lovem v České republice. Je jediným původním druhem rodu *Cervus* vyskytujícím se v Evropě.

Jedná se poměrně mohutné zvíře. Výška v kohoutku u jelena je 130 až 150 cm, u laně 115 až 130 cm. Tvar těla je válcovitý, štíhlý, u starších jedinců robustnější. Má dlouhé běhy, silný krk, zvláště u jelenů. Laně jsou v dospělosti štíhlé, se zaoblenou postavou s protáhlou hlavou na dlouhém štíhlém krku. Hmotnost jelena se pohybuje 100 až 180 kg, laně 70 až 95 kg. Vlivem těchto parametrů vyniká jelení zvěř mohutností, silou a v důsledku jejího chování i jistou vznešeností. Je to druh, který se vyznačuje teritorialitou a vysokými potravními nároky.

Jelení zvěř je součástí našeho kulturního a přírodního bohatství, které musíme zachovat i do budoucna. Její výhodou je velká přizpůsobivost a vývojová plastičnost, pomocí které se zvěř dokáže přizpůsobovat a reagovat na současné civilizační tlaky, které působí negativně na existenci velkých divokých zvířat.

Tento druh zvěře patří mezi přežvýkavce. To znamená, že zvěř zkonsumuje velké množství potravy, kterou poté v době klidu přežvykuje a tráví. Trávení probíhá v předžaludcích zejména vlivem mikroorganismů, které se nejen podílejí na tomto procesu trávení, ale dále poskytují přežvýkavci ochranu před nežádoucími mikroorganismy, které využívají trávicí trakt ke vstupu do organismu. Prostředí trávicího traktu je osídlováno velkým počtem mikroorganismů, což může několikanásobně převyšovat celkový počet buněk přežvýkavce. Mikroorganismy pomáhají využívat přežvýkavcům rostlinný materiál, který je bez těchto organismů pro jedince nestravitelný. Přežvýkavec poskytuje mikroorganismům ideální prostředí a podmínky pro jejich existenci. Přežvýkavec tak jako potravu využívá nejenom batorovou fermentací upravenou potravu, ale i biomasu mikroorganismů a jejich fermentační produkty. Struktura mikroorganismů v trávicím traktu přežvýkavců je tvořeno bakteriemi, prvky a anaerobními houbami.

Osídlení trávicího ústrojí mikroorganismy je popsáno již u většiny živočišných druhů i u člověka. Struktura těchto ekosystémů je ovlivňována a limitována faktory hostitele a okolního prostředí. Vzhledem k relativní nedostupnosti je při studiu mikroflóry osídlující trávicí trakt nejdůležitějším faktorem způsob odběru vzorků. Ve většině případů se používá metoda založená na odběru vzorků ze stolice, jelikož jiný odběr z vnitřních orgánů žijících

živočichů je velice problematické a složité a je zpravidla omezeno na odběry z mrtvých zvířat. U experimentálních zvířat lze použít zavedení kanyl nebo bioptické odběry vzorků.

Ze složitého odběru vzorků, komplexnosti mikrobiálního osazení a kultivovatelnosti jen části mikroorganismů přítomných v trávicím traktu vyplývá, že o vývoji a složení mikrobiální populace jelenovité zvěře nebo divoké jsou dostupné pouze omezené informace (PEARSON 1969). Objev molekulárně genetických metod umožnil dosáhnout celého spektra nových poznatků o složení ekosystémů osídlujících trávicí trakt jelenů nekultivačními technikami, jejich zásadní přínos spočívá v možnosti monitorovat výskyt tzv. nekultivovaných mikroorganismů, jež jsou klasickými mikrobiologickými postupy nezjistitelné. V předkládané práci byly tyto techniky použity k porovnání mikrobiální populace osídlující trávicí trakt jelenů žijících v rozdílných podmínkách, v oborách s intenzivním příkrmováním a ve volnosti.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo porovnat pomocí molekulárně biologických metod (denaturační gradientová gelová elektrofozéra DGGE, polymerázová řetězová reakce PCR, a PCR RealTime) složení mikrobiální populace osídlující bachor a mikrobiální populace obsažené v exkrementech jelena evropského ve dvou rozdílných způsobech chovu a to v chovu oborním a chovu ve volnosti.

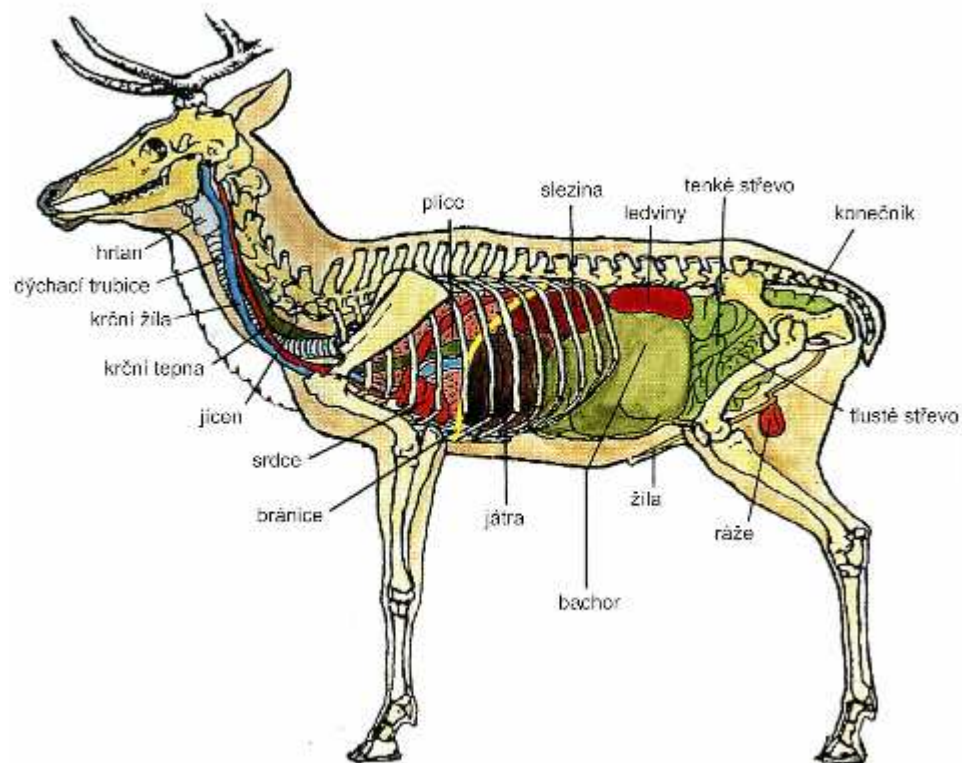
Práce je založena na hypotéze, že složení mikroflóry podílející se na pregastrické a postgastrické fermentaci bude odlišné u jelena chovaného v různých podmínkách a klade si za cíl tyto změny charakterizovat.

3. ROZBOR LITERATURY

3.1 Trávicí ústrojí jelení zvěře

Trávicí ústrojí tohoto druhu zvěře je výborně přizpůsobeno k přijímání velkého objemu rostlinné potravy. Z tohoto důvodu se ve vývoji tohoto druhu zvěře před samotným žaludkem vytvořil tříkomorový předžaludek, který umožňuje pojmout velké množství potravy při pastvě. Potravu zvěř přijímá bez značného rozmělnění a polyká ji ve velkých soustech. Tato potrava se hromadí v předžaludcích a po určitém období je nutné ji opět vrátit do dutiny ústní a dokonaleji zpracovat, tomuto jevu se říká přežvykování, čímž je tento druh zvěře typický. Přežvykování se děje ½ až 1 hodinu po příjmu potravy. Poté se již kvalitně zpracovaná potrava vrací zpět do předžaludků, kde již probíhá trávení mikrobiální a enzymatické (MIHOLOVÁ & LIPSKÝ 1976).

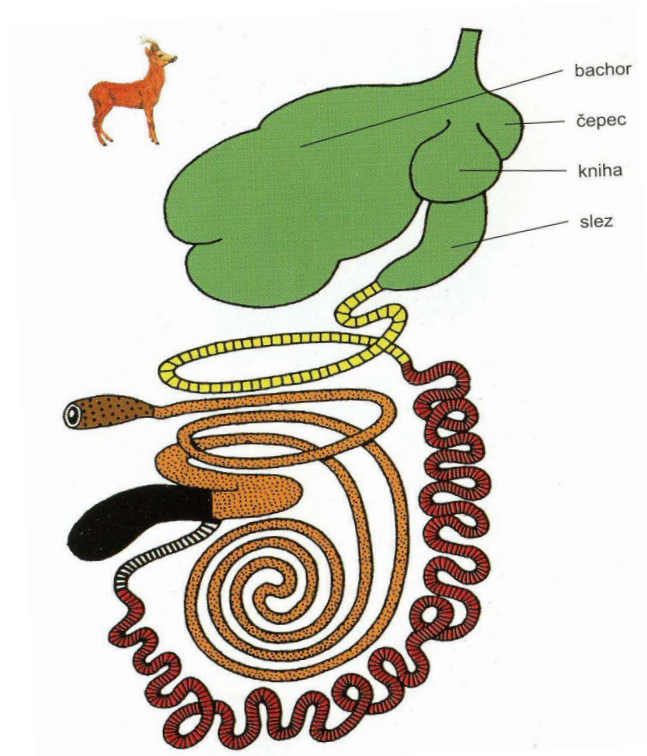
Obr. 1: Jelen lesní – průřez tělem (WINKELMAYER A KOL. 2005)



3.1.1 Anatomie trávicího ústrojí

Trávicí ústrojí u jelení zvěře začíná dutinou ústní, kde je mechanicky rozmělněna a poté jícnem přechází do předžaludků (WINKELMAYER A KOL. 2005). Dutina ústní obsahuje velké a malé slinné žlázy, které mají u přežvýkavců význam takový, že neutralizují kyselé prostředí bachoru. Předžaludek se skládají ze tří komor nazývaných jako bachor, čepec a kniha. Na tyto předžaludky navazuje samotný žláznatý žaludek, který se nazývá slez. Ze slezu potrava prochází do nejdelšího úseku trávicího ústrojí a tím je tenké a tlusté střevo (FOREJTEK A KOL. 2009). Zde dochází k trávení a vstřebávání základních minerálních složek potravy a vody. Trávení je ukončeno v konečníku, kterým vycházejí z těla nestrávené zbytky potravy (HANZAL 2006).

Obr. 2: Stavba trávicího traktu u přežvýkavců (WINKELMAYER A KOL. 2005)



3.1.1.1 Anatomie předžaludků a žaludku

Bachor

Je ze všech předžaludků největší. U mláďat je malý až do doby, než začnou přijímat objemnou potravu, se bachor začne zvětšovat a ve stáří 4 měsíců dosáhne konečné velikosti. Bachor je umístěn v dutině břišní na levé straně a zasahuje od bránice až k pánvi. Vypadá jako dva protáhlé na sobě uložené vaky (STEVENS & HUME 1995). Bachor je rozčleněn bachorovými pilíři, které vznikly zesílením svaloviny v místech, kde probíhají bachorové brázdy. Těmito pilíři je zapříčiněno systematické promíchávání bachorového obsahu a rozdělení bachoru na několik částí (HANZAL 2006). Spojnici mezi bachorem a čepcem tvoří bachorová předsíň, do které ústí jícen. Bachor je vystlán kutánní sliznicí, která je silně zrohovatělá a na jejím povrchu se vyskytují 1 cm vysoké papily jazýčkového tvaru, které jsou největší na dně bachorových vaků a směrem k pilířům se zmenšují a poté mizí (STEVENS & HUME 1995).

Čepec

Je umístěn mezi bránicí a bachorem, jeho tvar je zakulacený. Čepec je schopen při smrštění mít velikost jako pěst a je spojen s bachorem a knihou. Otvor mezi čepcem a knihou je tvořen uzavíratelným hladkosvalovým svěračem. Čepec má charakteristickou kutánní sliznici, která tvoří 1 cm vysoké hřebeny, které se mezi sebou kříží a vytváří čtyřboké až šestiboké čepcové komůrky. Hřebeny jsou poseté drobnými bradavkami.

Knih

Má kulovitý až oválný tvar. Nachází se na pravé straně od čepce a je umístěna nad slezem. Se slezem je spojena knihoslezovým otvorem, který se skládá ze dvou poloměsíčitých chlopní s neúplným svěračem, které uzavírají vstup do slezu. Spodní část knihy tvoří most, ke kterému směřují od stropu a bočních stěn vysoké a tenké listy knihy. Mezi konci listů a mostem je volný knihový kanál. Listy mají půlměsíčitý tvar a jsou pokryty drobnými papilami.

Slez

Je to vlastní žaludek přežvýkavců, který je uložen na spodině přední části dutiny břišní. Jeho rozšířený kraniální konec se dotýká čepce a konec vrátníkový přechází do tenkého střeva. Sliznice slezu vytváří 12 až 14 dlouhých nevyhladitelných řas spirálovitého průběhu a je v celém rozsahu žláznatá, hladká, narůžovělá a kluzká. Svalovina je hladká. Obalovou vrstvu tvoří pobřišnice, která přechází na slez z bacheru a tvoří velkou oponu, z knihy tvoří oponu malou. Opony obalují orgány a tvoří izolační vrstvy, které jsou rezervoárem tuku (MIHOLOVÁ & LIPSKÝ 1976).

3.1.1.2 Pohyby předžaludků

Předžaludky vykonávají pravidelné pohyby, které jsou přerušované obdobími klidu. Pohyby bacheru a čepce na sebe navazují a trvají 1 minutu. Tyto pohyby, které se nazývají čepcobacorové jsou tvořeny 2 smršťovacími pohyby čepce a 2 kontrakcemi bacheru. V 1. fázi dochází ke smrštění čepce na polovinu své velikosti. Dochází k přesunu části potravy do knihy, jejíž konzistence je tekutější. Poté se čepce smrští úplně. Obsah je přemístěn do bacherové předsíně. Tento stah je následován 1. kontrakcí bacheru v podélném směru. Při sekundárním stahu dochází ke smrštění dorzálního a ventrálního vaku (STEVENS & HUME 1995). Pravidelné opakování kontrakcí bacheru je doprovázeno zvukovými efekty, podle kterých lze zjistit bacherový koeficient, pomocí kterého je možné popřípadě zjistit zdraví zvířete. Jeho hodnota u zdravých zvířat je 2 – 3. Kontrakcemi dochází k promíchání obsahu mezi bacherem a čepcem za vzniku plynů, zředění obsahu a přechodu tekutější části do knihy. Pohyby knihy jsou charakteristické stahy vcelku a pohyby listů. Pomocí listů se potrava lisuje a tekutá část padá na most knihy, kde je potrava odváděna do slezu pomocí stahů. Větší strukturu potravy knihoslezový otvor nepropustí.

Pohyby předžaludků jsou řízeny nervovou soustavou. Ve stěnách předžaludků jsou nervové pleteně. Činnost pletení řídí pohyby předžaludků ještě krátkou dobu po jejich vyjmutí z těla mrtvého zvířete (MIHOLOVÁ & LIPSKÝ 1976).

3.1.2 Fyziologie předžaludků a žaludku

Potrava, která je přijata přichází do batoru, kde je promíšena s jeho obsahem a následně začíná mikrobiální trávení. Živiny uvolňované při tomto kroku jsou částečně vstřebávány epitelem batoru, většina však postupuje do dalších oddílů trávicího traktu. Batorové pilíře a slepé vaky mají funkci zadržovací, aby zpomalily průchod krmiva batorem, kvůli dostatečné době pro rozklad rostlinné hmoty.

Po rozkladu přechází natrávená potrava v polotekutém stavu z batoru do čepce, který působí jako aktivní separační orgán. Rytmičnými kontrakcemi čepce jsou hrubší části zadrženy na stěnách a jemnější části jsou vytlačeny do knihy. Hrubší části jsou nedostatečně zpracovány a vracejí se zpět k přežvýkání a fermentaci do batoru. Kniha plní mechanickou funkci, při které svými listy drtí potravu a také má funkci vstřebávací. Ve slezu jako v žaludku přežvýkavců probíhá enzymatické trávení mikrobiálně zpracované potravy a biomasy mikrobů (STEVENS & HUME 1995).

3.1.3 Strategie přežvýkavců při využívání krmiv

Anaerobně probíhající fermentaci zajišťují v předžaludcích mikroorganismy. Jsou to především různé druhy bakterií, protozoí a také houby. Všichni býložravci jsou na symbiotickém spojení s mikroorganismy osídlujícími trávicí trakt závislí. Kvůli jejich schopnosti získávat energii z rostlinných pletiv, které jsou pro samotného savce nevyužitelné. Zásadní výhodou fermentace v předžaludcích je, že hostitelský organismus nevyužívá pouze živiny vzniklé působením mikrobiálních enzymů na tráveninu, ale i biologicky vysoce hodnotnou stále se množící biomasu mikroorganismů, jež sestává dalším potravním zdrojem v postgastrickém trávicím procesu (FLINT 1997). Tyto procesy probíhají v předžaludcích, především batoru, postgastrická fermentace se odehrává ve slepém střevu a tračníku.

V batoru probíhá především mechanické zpracování přijaté potravy a fermentace činností mikroflóry. Bator je jakýsi fermentor, který vytváří ideální prostředí pro růst, rozmnožování a látkovou výměnu mikroorganismů. V jeho nitru se vytváří velmi stabilní a biochemicky aktivní mikrobiální ekosystém. Skládá se z mnoha článků propojených celou řadou vzájemných interakcí jak mezi sebou, tak i s hostitelským organismem (MACKIE 2002). Umožňují lépe využít krmiva na živiny cenné pro organismus hostitele.

Fermentační proces umožňuje dokonaleji trávit vlákninu obsaženou v těchto krmivech. V důsledku proteosyntézy mikroorganismů se efektivněji využívají nebiłkovinné dusíkaté látky za vzniku hodnotné bíłkoviny. Na druhé straně za určitých podmínek, může docházet narušením optimální fermentace k degradaci plnohodnotných bíłkovin a k proteolýze. Ostatní ztráty vznikají u jednodušších energetických živin. Správnou úpravou krmiv a složením krmné dávky lze negativní vlivy omezit a využít potenciál mikrobiálního trávení (RUSSEL & HESPELL 1981).

V průběhu ontogenetického vývoje se funkce předžaludků a mikrobiálního osídlení rozvíjí a fermentace v batoru se zintenzivňuje (FONTY A KOL. 1984). K mikrobiálnímu osídlení batoru mláďat dochází již při porodu s prvním kontaktem s matkou. Olizováním přechází část batorové mikroflóry z jejich slin na mláďě (KLEIN A KOL. 1987). Další osídlení epifytními mikroorganismy nastává při příjmu rostlinných krmiv, kterými se do batoru dostává velké množství mikroorganismů (CHURCH 1962). Vybrané druhy krmiv jako jsou např. seno, pastva, okopaniny svými pletivy poskytují substrát pro mikroorganismy a tak pozitivně ovlivňují jejich vývoj. Na druhé straně krmiva dieteticky a nutričně nevhodná jako jsou nekvalitní siláže dokáží během několika dnů poškodit mikrobiální osazení batoru nebo jej úplně zlikvidovat. Negativně mohou působit dietní nedostatky, nedodržení žádoucího poměru živin, hygienické nedostatky atd. Pokud chceme docílit dobrého zdravotního stavu a vysoké užitkovosti zvěře, je nutné optimálně využívat živiny, které jsou velice důležité a ovlivňují úroveň batorového trávení (VESELÝ A KOL. 1984).

3.1.4 Batorový mikrobiální ekosystém

Výzkum mikrobiálního složení batoru spadá do 40. let 20. století, při kterém bylo využíváno anaerobních technik a simultánního prostředí batoru. Touto metodou bylo popsáno velké množství mikrobiálních druhů osidlujících bator přežvýkavců. (HUNGATE 1950). Nástupem nových molekulárně biologických metod v 90. letech dochází k přesnému zařazování mikroorganismů osidlujících bator (LENG A KOL. 2011).

Mikrobiální osazení bacheru je v zásadě tvořeno třemi druhy mikroorganismů:

1. Bakterie – je nejpočetnější skupina v bacherovém ekosystému, jejich hustota je 10^{10} – 10^{11} buněk v 1 ml bacherového obsahu, jsou zastoupeny několika tisíci anaerobními druhy, tvoří 50 % populace bacheru (KRAUSE & RUSSEL 1996),
2. Prvoci – je druhá nejpočetnější skupina mikroorganismů, jejich hustota v 1 ml bacherového obsahu je 10^4 – 10^6 , jejich zastoupení je kolem 40 druhů, tvoří 40 % populace bacheru (COLEMAN 1980),
3. Houby – poslední skupina mikroorganismů, jejich hustota je kolem 10^5 v 1 ml bacherového obsahu, jejich zastoupení je 16 druhů (ORPIN & JOBLIN 1997).

3.1.4.1 Bakterie

Bakteriální druhy jsou zařazeny podle své významnosti před prvoky a houby. Jejich význam je především v produkci těkavých mastných kyselin. Dnes je jejich počet odhadován na několik tisíc druhů. Jejich počet v jednom ml bacherového obsahu se v průběhu dne mění. Tento jev je způsoben zředěním bacherových mikroorganismů vlivem příjmu potravy, vody a také slinami. Dalším vlivem, kterým se může snížit počet bakterií v bacheru je dlouhodobé hladovění, kdy je bacherová fermentace narušena. Po skončení hladovění se fermentace v bacheru vrátí do původního stavu do dvou dnů.

Členění bacherových bakterií je u autorů velice rozdílné. Z tohoto důvodu jsem zvolil členění podle vztahu k substrátu zavedené autorem, který položil základy dělení bacherových bakterií (HUNGATE 1966):

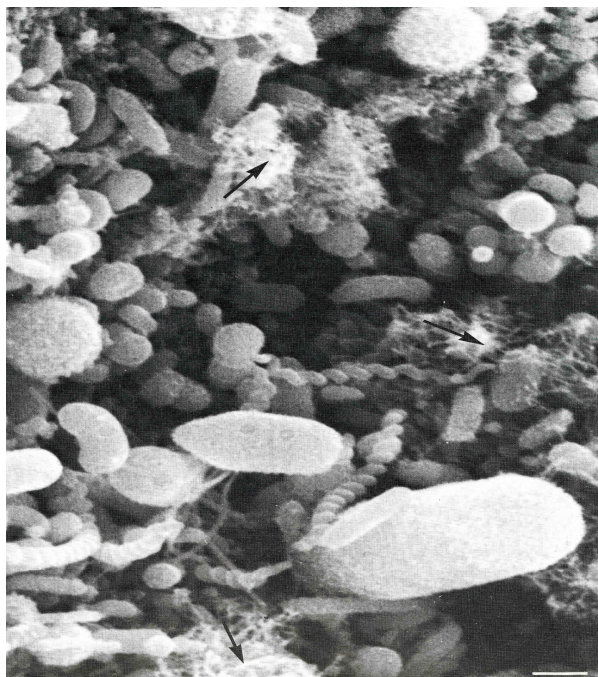
1. Celulolytické bakterie: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium lochheadii*, *Clostridium longisporum*
2. Hemicelulolytické bakterie: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *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 amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*, *Prevotella ruminicola*
6. Ureolytické bakterie: *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas ruminantium*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminicoccus 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 mobile*, *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 (MCALLISTER A KOL. 1994):

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 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 minimální
5. Bakterie vázané na povrch bachorových prvoků – podíl na trávení minimální

Obr 3: Bachorová bakterie přisedlá k epitelu bachoru (CHENG A KOL. 1981)



3.1.4.2 Prvoci

V bachoru se vyskytuje asi 160 druhů prvoků. Jejich počet je ovlivněn složením krmiva, pH, průběhem trávení a fyziologickým stavem zvířete (JOUANY 2006). V 1 ml bachorové tekutiny za dobrých fyziologických podmínek je 300 – 700 tisíc prvoků. Jejich přítomnost se považuje za dobrou úroveň bachorového trávení. Množství prvoků v bachoru se mění podle způsobu výživy. V případě dlouhodobého hladovění dochází po třech dnech k úplnému vymizení bachorových prvoků. Bakterie a houby zůstávají. Sice se jejich počet sníží, ale nedojde k vymizení jako u prvoků. Prvoci jsou náročni na živiny. K výzkumu významů prvoků pro bachorovou fermentaci byla používána tzv. defaunovaná zvířata, jejich bachor byl různými chemickými činidly prvoků zcela zbaven (JOUANY A KOL. 1988). Prvoci tvoří 40 % mikrobiálního osazení bachoru. V bachorovém prostředí se jich nachází kolem 40, především zástupci třídy *Ciliate*, která má dvě podtřídy *Holotricha* a *Entodiniomorpha* (HUNGATE 1966).

Do podtřídy *Holotricha* patří rody *Isotricha* a *Dasytricha*, fermentující cukry a rod *Isotricha* fermentující škrob.

Do podtřídy *Entodiniomorpha* patří rody *Diplodinium*, *Entodinium* a *Epidinium*. Jsou schopny fermentovat hemicelulózu, pektin a škrob za využití rozpustných cukrů. První dva zmíněné rody jsou schopny fermentovat celulózu (WILLIAMS & COLEMAN 1985).

3.1.4.3 Houby

Bachorové anaerobní houby se podílejí na trávení vlákniny. Rozrušují rostlinná pletiva a umožňují bakteriím pronikání do těchto pletiv. Anaerobní houby mají největší význam při trávení krmiva bohatého na vlákninu. (MOUNTFORT & ASHER 1989).

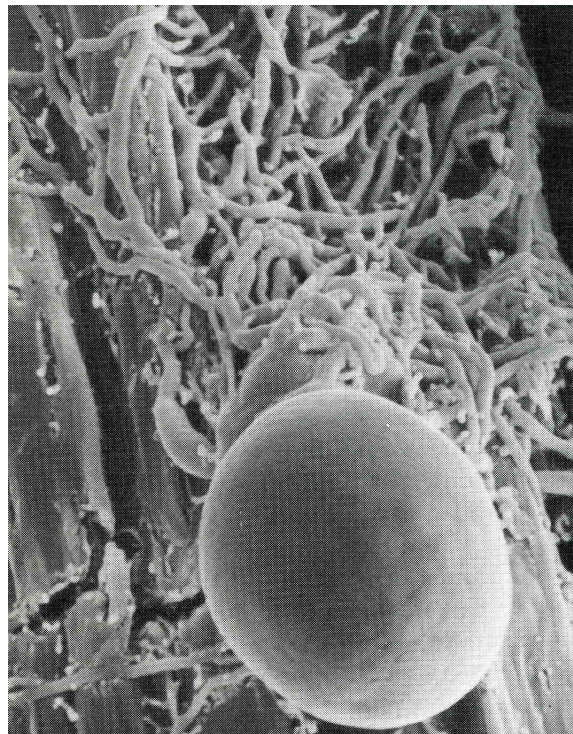
V dnešní době je popsáno 21 druhů anaerobních bachorových hub, které jsou zařazeny do 6 rodů (THEODOROU 1996): *Cyllamyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix*, *Piromyces*.

Do rodu *Piromyces* patří anaerobní bachorová houba *Piromyces minutus*, která byla izolována u jelena evropského (HO A KOL. 1993).

3.1.4.4 Ostatní mikroorganismy

Z dalších mikroorganismů lze v bachoru nalézt ještě kvasinky, viry a fágy, jejich nutriční význam však je zanedbatelný.

Obr. 4: Mycelium anaerobní bachorové houby *Neocallimastix frontalis* osídlující rostlinné pletivo (THEODOROU A KOL. 1988)



3.1.4.5 Fermentace v předžaludku

Mikroorganismy u přežvýkavců hrají klíčovou úlohu v procesu trávení přijímané potravy. Vlivem mikroorganismů probíhá mikrobiální fermentace, která probíhá v předžaludcích a tračníku. Fermentace přináší přežvýkavcům 4 výhody:

1. Degradaci strukturálních polysacharidů, mezi které patří celulóza, hemicelulóza a pektin. Tyto polysacharidy jsou obsaženy v rostlinné potravě. Pro přežvýkavce představují hlavní zdroj energie (FORSBERG A KOL. 1997).
2. Schopnost mikroorganismů na sebe vázat neproteinový dusík, využívat jej k syntéze vlastní biomasy a v zažívacím traktu tak vytvářet 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 & WARNER 1980).

Bakterie osidlující bачor mohou být děleny podle své velikosti, tvaru, nejčastěji jsou však děleny podle schopnosti fermentovat substrát do 8 skupin: celulolytické, hemicelulolytické, amylolytické, sacharolytické, proteolytické, lipolytické, uklizující aminokyseliny a metanogenní. Někdy jsou ještě zařazeny pektinolytické a producenti amoniaku. Většina druhů bakterií je však schopna podílet se na fermentaci více substrátů (HESPELL A KOL. 1997). Metabolismus sacharidů zaujímá v bачorové biochemii významné místo. Především strukturní polysacharidy rostlin, ale i monosacharidy, disacharidy a oligosacharidy, procházejí za anerobních podmínek štěpením a jsou celulolytickými, hemicelulolytickými, xylanolytickými, pektinolytickými a sacharolytickými bakteriemi postupně přeměněny na těkavé mastné kyseliny, metan, oxid uhličitý, vodík, kyselinu mravenčí, kyselinu mléčnou, etanol, případně další produkty (HINTNAUS 2011). Produkce těkavých mastných kyselin je značná. Kyseliny se vstřebávají stěnou bачoru. Nejvýznamnějším výsledným produktem bачorové fermentace jsou těkavé mastné kyseliny, především kyselina octová, propionová a máselná. Tyto kyseliny představují až 40 % energie potřebné pro hostitelský organismus. Tvoří 95 % veškerých bачorových kyselin. Výchozím substrátem pro tvorbu těkavých mastných kyselin je především vláknina a ostatní sacharidové komponenty diety (95 % škrobu, 54 % hrubé

vlákniny), na jejich vzniku se podílejí další živiny: ze 40 – 80 % bílkoviny a rovněž tuky štěpící se působením lipolytických bakterií (PENNINGTON 1952).

Bachorovou fermentaci lze kvantifikovat pomocí celkové produkce a proporciálního zastoupení těkavých mastných kyselin. Při plnohodnotné krmné dávce je molární procento jednotlivých mastných kyselin v bachoru závislé především na typu dávky a jejím složení. Nejčastěji se uvádí průměrné množství mastných kyselin v krmné dávce takto:

- kyselina octová: 50 – 65 mol %
- kyselina propionová: 20 – 25 mol %
- kyselina máselná: 10 – 20 mol %
- kyselina mravenčí, valerová, kapronová a vyšší mastné kyseliny: 5 mol %.

Tento poměr mezi těkavými mastnými kyselinami v bachoru má značný význam pro vývoj a zdraví zvíře. Do značné míry je ovlivněn složením krmné dávky. Množství vlákniny v krmné dávce ovlivňuje vzájemný poměr produkovaných mastných kyselin. V případě nadměrného množství lehce stravitelných glycidů (např. jadrných krmiv) v krmné dávce dojde ke zpomalení někdy až k zastavení trávení vlákniny. Začne zvýšená tvorba kyseliny mléčné, která zvyšuje kyselost bachoru. V tomto případě začne klesat pH. Tento stav, acidóza, vede ke snížení počtu některých významných mikroorganismů, zpočátku především celulólytických, později i většiny ostatních mikroorganismů a zásadně se změní druhové proporce ekosystému (BRAUN A KOL. 1992). Aktivita fermentace závisí do značné míry na podmínkách bachorového prostředí, především na hodnotě pH. Většina enzymů vykazuje optimální aktivitu při tzv. fyziologickém rozmezí pH 6,2 – 6,8 (KAY 1960), podobně i řada bakterií, zejména fibrolytických, je k poklesům pH velmi citlivá (BRAUN A KOL. 1992).

Nepřežvýkaví býložravci tráví celulózu v tlustém střevě (STEWART 1997), masožravci ji nedovedou využít vůbec. Na degradaci vlákniny se významně podílejí produkcí fibrolytických enzymů i anaerobní houby (MOUNTFORT & ASHER 1989). Pomocí enzymatických systémů bakterií, protozoí a hub dochází k odbourávání pektinů. Zásobní polysacharidy (škrob a pektin) jsou degradovány obdobným způsobem. Monosacharidy a disacharidy složí jako zdroj energie pro ostatní bakterie. Na fermentaci škrobu, dextrinů a lehce rozpustných cukrů se výrazně podílejí bachorové prvoci. Produkují oxid uhličitý, vodík, kyselinu octovou, kyselinu propionovou a kyselinu máselnou. Prvoci pohlcují zrnka škrobu a mění jej na glykogen. Dochází ke kvašení, při kterém se uvolňuje a vzniká

především CO₂ a metan díky symbiotickému spojení s metanogenními bakteriemi nasedajícími na povrch těl prvoků (FILAY & FENCHEL 1992). Většina těchto plynů vzniká při mikrobiální fermentaci sacharidů (BARTOŠ 1987). Nejintenzivnější produkce je asi 4 hodiny po nakrmení. Plyny jsou odváděny z batoru prostřednictvím vstřebáním do krve, vylučováním plícemi nebo krkáním do jícnu a dutiny ústní.

Z batorového obsahu bylo izolováno celkem málo kmenů lipolytických bakterií. U přežvýkavců se často přehlíží význam tuků. Jsou důležité vlivem své energetické hodnoty a mají význam pro vznik esenciálních mastných kyselin a lipofilních vitamínů. Batorové bakterie jsou rovněž producenty vitamínu K a vitamínů skupiny B.

Bakterie, které jsou schopny štěpit bílkoviny se nazývají proteolytické. Většina těchto bakterií je schopny rozkládat i sacharidy. Tyto bakterie štěpí bílkoviny na aminokyseliny, které procházejí desaminací za vzniku amoniaku, mastných kyselin a oxidu uhličitého. Z hlediska bílkovin je tento proces s vyšší biologickou hodnotou nevýhodný. Je snaha chránit tyto bílkoviny a dopravit je do dalších částí trávicího ústrojí k enzymatickému trávení.

Vedle štěpných procesů v batoru probíhá syntéza mikrobiálních bílkovin. Jednotlivé prvky jsou důležité pro tuto syntézu. Jsou k dispozici okamžitě a v požadovaném množství. Do těchto prvků patří uhlík, energie vzniklá ze sacharidů a těkavých mastných kyselin a dusík z krmiva nebo ze syntetických zdrojů. Zejména 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 & HESPELL 1981). Jejich denní produkce je 100 – 150 g představující až ¼ denní potřeby makroorganismu.

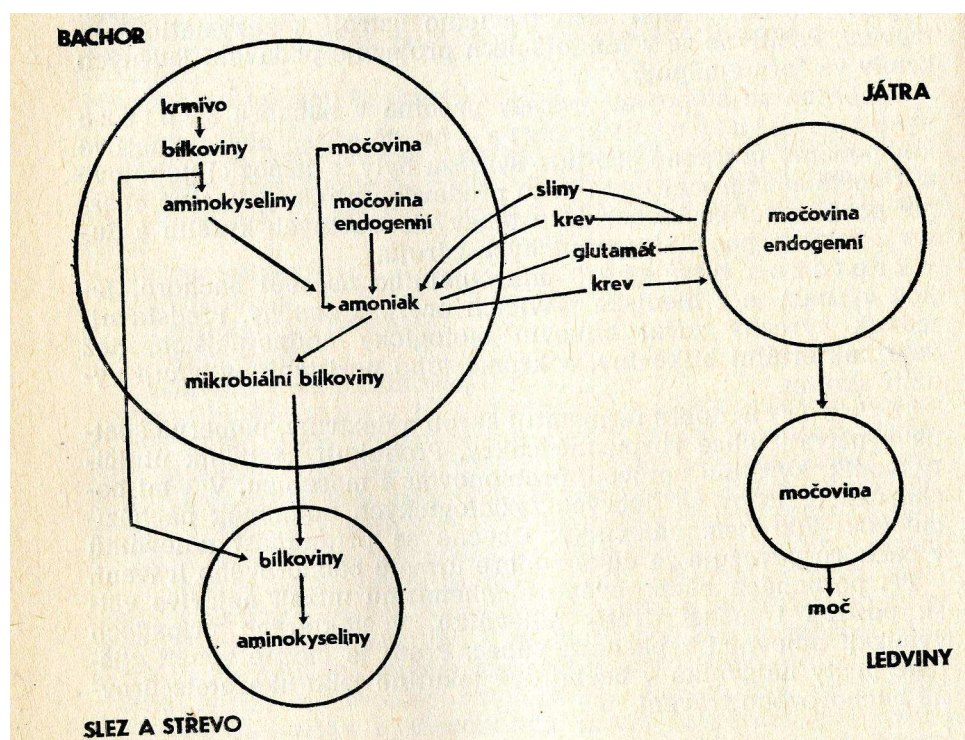
3.1.4.6 Mikrobiální proteosyntéza

Mikrobiální syntéza probíhající v batoru má význam pro hospodaření s dusíkatými látkami, hlavně s bílkovinami. Dusíkaté látky z biomasy vytvořeny prostřednictvím batoru využitím dusíkatých krmiv představují 50 – 70 % dusíkatých látek potřebných pro organismus. Zbytek potřeby organismu je zajištěn dusíkatými látkami přímo z krmiv (VESELÝ A KOL. 1984).

Bílkoviny se v bacheru rozkládají na jednoduché dusíkaté složky. Jsou metabolizovány na mikrobiální bílkoviny (IBRAHIM & INGALLS 1972). Amoniak vzniká při rozkladu bílkovin. Při proteosyntéze není využit, kvůli nedostatečnému množství mikroorganismů nebo nedostatku energie. Při vysokém příjmu dusíkatých látek se amoniak dostává do jater, kde dochází k ureosyntéze a tvorbě endogenní močoviny. Močovina se vrací krví a slinami zpět do bacheru a část se vylučuje močí. Když dojde množství volného amoniaku až ke kapacitní možnosti ureosyntézy v játrech, dochází ke zvýšení obsahu amoniaku v krvi a v tom případě nastávají klinické projevy intoxikace.

Když jsou nutriční podmínky dobré, tak se až 90 % nebílkovinného dusíku využije na mikrobiální bílkovinu. Část bílkovin asi 20 – 60 % prochází předžaludky beze změny a k trávení dochází enzymatickou cestou v dalších částech trávicího ústrojí.

Obr. 5: Schéma přeměny dusíkatých látek u přežvýkavců (VESELÝ A KOL. 1984)



Vlivem podávání syntetických zdrojů dusíkatých látek se může mikrobiální proteosyntéza zvýšit, vlivem močoviny a čpavku. Za předpokladu, že mikroorganismy v bacheru musí mít dostatek pohotové energie na adaptaci na tyto látky, která tvoří 30 % z celkové energie v krmivu. Pro tvorbu mikrobiální bílkoviny je důležité překládat vhodné krmivo se zdrojem dusíku (WALLACE A KOL. 1987). Vhodným krmivem jsou lizy a silážní

kyseliny. S ohledem na mikrobiální proteosyntézu je produkční efekt při podávání krmiv s plným krytím dusíkatých látek ze syntetických zdrojů asi 60 – 70 % v porovnání s bílkovinnými zdroji z tradičních krmiv. V důsledku porušení zásad využívání syntetického dusíku nebo neregulovaném přístupu zvířat k těmto zdrojům hrozí nebezpečí intoxikace se smrtelným průběhem. Dochází k alkalizaci pH bachoru na hodnoty 7,5 a vyšší. Mění se poměr mezi formou NH_3 a NH_4 ve prospěch NH_3 , která je snadno propustná buněčnými membránami. Tímto faktorem dochází k urychlení intoxikace. K intoxikaci dochází v poměrně krátké době. Tato doba se pohybuje v rozmezí 30 minut po podání močoviny v důsledku uvolnění amoniaku. Intoxikace je způsobena nedostatkem energie, nedostatečným návykem na novou krmnou dávku a techniku jejího podávání, či nevhodné formy úpravy krmiva (VESELÝ A KOL. 1984).

3.1.4.7 Fermentace v tlustém střevu

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 přežvýkavců probíhá sekundární fermentace vlákniny a nestrávených zbytků potravy označována jako postgastrická (HUME 1997). Sekundární fermentace odbourává 27 % přijaté celulózy a 40 % hemicelulózy (BAILEY & MCRAE 1970). Tlusté střevo je vystláno sloupcovitým epitelem, který obsahuje pohárkovité buňky, které produkují mucin. Mucin je forma elastického a viskózního gelu, který usnadňuje pohyb tráveniny tračníkem. Mucin poskytuje ochranu tlustému střevu před přilnutím a invazí patogenních bakterií, mikrobiálních antigenů a toxinů (ALLEN 1981). Sliznice tlustého střeva vstřebává metabolity včetně těkavých mastných kyselin uvolněných působením tračnickových mikroorganismů (REDDY A KOL. 1992). Zdejší ekosystém je podobný bachorovému a využívá potravních komponent, které unikají fermentaci v bachoru. U přežvýkavců tak slouží jako doplňkový systém ke zvýšení fermentační účinnosti, u nepřežvýkavých býložravců přebírá funkci předžaludků.

3.2 Výživa jelení zvěře

Jak již bylo zmíněno, tak je jelen evropský 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 (DURANTELO 2004).

Přírozenou potravu tvoří řada rostlinných druhů, které se u nás vyskytují. Skladba přírozené potravy jelena lesního je stejná jako i v jiných částech Evropy. Dnešní stav životního prostředí vlivem civilizace a industrializace prostředí, ve kterém žije neposkytuje jelení zvěři volný výběr rostlinné potravy (LOCHMAN 1985; SUNDSET A KOL. 2010). Je důležité zachovat zvěři klidové oblasti v jejím přírodním prostředí (JELÍNEK 2007). Posledním faktorem, který ovlivňuje příjem potravy je roční období. Vlivem ročního období se také mění požadavky na složení a poměr jednotlivých složek potravy (SUNDSET A KOL. 2009). Jde především o období letní a zimní. HINTNAUS (2011) uvádí, že vliv na výši a druh přijímané potravy má hormon melatonin, který je uvolňován endokrinními žlázami na základě světelných podmínek zachycených sítnicí oka.

VODŇANSKÝ (2008) uvádí, že celková doba příjmu potravy jelení zvěře v jarních a letních měsících činí 400 až 470 minut (kolem 5 – 7 hodin). To znamená kolem 28 až 33 % z celkového denního cyklu. Většina doby strávené příjmem potravy je v rozmezí mezi západem a východem slunce. V průběhu denní doby se z 65 – 72 % času týká pastevních aktivit. V noční periodě mezi západem a východem slunce se 28 – 35 % z celkové doby týká příjmu potravy. Tyto jednotlivé fáze příjmu potravy jsou od sebe odděleny časovými úseky, při kterých jelení zvěř potravu přežvykuje.

Jelen evropský patří mezi potravní oportunisty, což jsou druhy, které jsou velice přizpůsobivé a jsou schopni přijímat potravu lehce i hůře stravitelnou. Musí přijímat potravu s větším množstvím celulózy, která prochází déle trávicím traktem, a proto má méně potravních period. Zásadním způsobem kvalitu krmiv ovlivňuje i složení půdy (STARK A KOL. 2010). Příjem potravy jelena lesního má dva vrcholy. První je v srpnu a druhý v prosinci (LOCHMAN 1985). Vrcholy příjmu potravy jsou vystřídané opětovným snižováním přijaté potravy a u samců v době říje dochází až k hladovění. Toto hladovění způsobuje rozvoj hormonálních aktivit varlat, které ovlivňují chování jelenů. V říji jelenům chybí v bacheru potravina pro mikroorganismy a počty bakterií v bacheru klesají až na jednu

pětinu jarního stavu. Prvoci z bachoru vymizejí. Dochází k vylučování adrenalinu, který štěpí tuk v tukových depech, za uvolnění energie ve formě volných mastných kyselin. Tuto energii organismus nedokáže celou využít a dochází k ukládání nadbytečné energie do jater sloučením nadbytečných tuků s bílkovinami potravy a vznikem lipoproteinů. Lipoproteiny se transportují zpět do tukových skladů. Hromadění tuků v játrech omezuje metabolickou aktivitu jaterních buněk. Při velkém nahromadění tuků dochází ke ztučnění jater (VACH A KOL. 1996).

Ke konci říje se snižuje množství těkavých mastných kyselin. Dochází k intenzivní potřebě příjmu potravy trvající až do jara. Po říji jsou jeleni unaveni a zůstávají raději v krytu v blízkosti potravy, kde odpočívají. V tomto období přijímají potravu bohatou na vlákninu i potravu obsahující glycidy, které jim vytvářejí tukové zásoby na zimu. S vysokou intenzitou přijímání potravy souvisí vytváření energetických zásob ve formě tuku, které má dva vrcholy.

První vrchol je v období měsíce srpna. Jeleni vyhledávají potravu bohatou na snadno stravitelné rostliny s vysokým obsahem glycidů, bílkovin a zejména vlákniny ve formě travin a bylin. V tomto důsledku dochází k pomnožení celulólytických mikroorganismů. Složení potravy má zásadní vliv na četnost jednotlivých skupin mikroorganismů, např. vysoký podíl vlákniny a lignocelulózových komponent v dietě zvýší zastoupení fibrolytických (celulólytických, xylanolytických a hemicelulólytických) bakterií, naopak zvýšení podílu jaderných krmiv způsobí nárůst amylolytických druhů (WANAPAT A KOL. 2009). V září dochází ke snížení intenzity příjmu potravy, zvyšuje se pohybová aktivita jelenů za snížení tukových zásob.

Druhý vrchol příjmu potravy je v období měsíce prosince. Tento vrchol spočívá v množství deponovaného tuku, který je potřebný k překonání dobu strádání. Poté následuje postupné snižování příjmu potravy a pokles tukových zásob. V měsíci březnu je množství tukových zásob minimální (HINTNAUS 2000). Největší intenzita látkového metabolismu je období měsíce května a června, kdy dochází k obnově sil ztracených v době strádání, které je energeticky pro zvěř náročné. Zvěř si vytváří podmínky pro úspěšnou reprodukci (VACH A KOL. 1996). V neposlední řadě do složení potravy jelení zvěře zasahuje člověk ovlivněním nabídky krmiv zemědělskou činností na polních honech nebo přikrmováním či přímo intenzifikací chovu v oborách (COLMAN A KOL. 2009; MILLER A KOL. 2010).

3.2.1 Složení potravy jelení zvěře

Potrava jelení zvěře je složena z pěti základních složek, do kterých patří objemná krmiva, jadrná krmiva, dužnatá krmiva, minerální doplňky a vitamíny a voda. Tyto druhy potravy tvoří nenahraditelnou funkci a musí mít patřičné zastoupení v daném ročním období. Je důležité poznamenat, že se velice liší složení potravy ve volném chovu zvěře a v chovu oborním. Ve volnosti se zvěř přikrmuje pouze v době strádání, což znamená v pozdním podzimu a v zimě. Naproti tomu v oborním chovu se zvěř přikrmuje po celý rok.

3.2.1.1 Objemná krmiva

Tyto krmiva jsou charakteristické nízkou koncentrací živin a energie, naproti tomu mají velký obsah vlákniny a ligninu, což znamená, že pro tento druh zvěře tvoří hlavní zdroj potřebných živin. Je důležité, aby zvěř měla dostatečné množství tohoto krmiva pro správné fungování předžaludků. Do skupiny těchto krmiv patří především všechny druhy travin a bylin, jak čerstvé, tak i konzervované sušením nebo silážováním. Patří sem i veškeré letorosty jehličnatých i listnatých dřevin (VACH A KOL. 1996).

V zimním období mají velký význam sušená objemná krmiva, která tvoří hlavní zdroj živin v zimním období. Obsah sušiny v těchto krmivech se pohybuje kolem 85 %. Dalším zdrojem objemných krmiv jsou krmiva silážovaná, která vznikají při mléčném kvašení bez přístupu vzduchu. Toto krmivo má obsah sušiny kolem 35 % (VACH A KOL. 1996).

3.2.1.2 Jadrná krmiva

Mezi tato krmiva patří obiloviny, luštěniny, výrobky tukového průmyslu, horkovzdušné úsušky objemných nebo dužnatých krmiv a průmyslově vyráběné jadrné krmné směsi. Do této kategorie můžeme zařadit i sušené ovocné výlisky, kaštiny, žaludy a jeřabiny (ŠTĚPÁNEK A KOL. 2003). Tento druh krmiv je charakteristický vysokou koncentrací energie a živin, které obsahují na 85 % sušiny (VACH A KOL. 1996).

V průběhu přikrmování těmito krmivy je důležité dodržovat určité zásady, jelikož tato krmiva jsou pro zvěř velice chutná a je možné, že zvěř zkonsumuje nadměrné množství. To se projeví zažívacími poruchami a horším zdravotním stavem, což může vést až k úhynu zvěře. Proto je důležité předkládat takové množství, aby každý kus přijal pouze omezené množství a nedocházelo k přílišnému pozření tohoto druhu krmiva. Platí také

zásada předkládat takové krmivo, které by mělo doplnit jakousi přirozenou krmnou dávku pro každý kus, který odpovídá danému pohlaví a ročnímu období (VACH A KOL. 1996).

3.2.1.3 Dužnatá krmiva

Tato krmiva jsou charakteristická nízkou koncentrací živin s vysokým obsahem vody. Mají dietetický význam s cennými zdroji vitamínů a provitaminů. Do tohoto druhu krmiva patří okopaniny (krmná řepa, cukrová řepa, mrkev, brambory, topinambury, vodnice, tuřín), průmyslové odpady z jejich zpracování (cukrovarské řízky), kedlubny, zelí, ovoce a plodnice některých vyšších hub. Těmito krmivy se zvěř přikrmuje v menších dávkách po celou zimu až do předjaří (VACH A KOL. 1996).

3.2.1.4 Minerální doplňky a vitamíny

Tato položka krmné dávky je důležitá v období, kdy zvěř prochází určitým vývojem ve svém životě, což je v době růstu mladé zvěře, růstu paroží u samců, při růstu plodu u březích samic a samozřejmě při kojení mláďat (VACH A KOL. 1996).

Minerální látky můžeme rozdělit na makroprvky a mikroprvky.

Makroprvky jsou důležité pro dobrou kondici a správný růst. Řadí se do nich vápník, fosfor, hořčík, sodík a síra.

Mikroprvky jsou obsaženy v krmivech v daleko menším množství než makroprvky. Do této skupiny patří železo, mangan, zinek, měď, kobalt, jod a selen.

Minerální látky se vzájemně ovlivňují, je důležité udržovat vyrovnaný poměr těchto látek.

Další nezastupitelnou složkou v potravě zvěře jsou vitamíny. Pro tuto zvěř jsou nejdůležitější vitamíny A, D a E. U těchto vitamínů je také důležité věnovat správný poměr, aby případné snížení přísunu přirozené potravy bylo aplikací těchto látek dosaženo vyrovnané výživy. Tyto látky se podávají zvěři přimícháním do ostatních krmiv, většinou se přidávají ke krmivům jadrným (KUKAŇOVÁ & PICKA 2008).

3.2.1.5 Voda

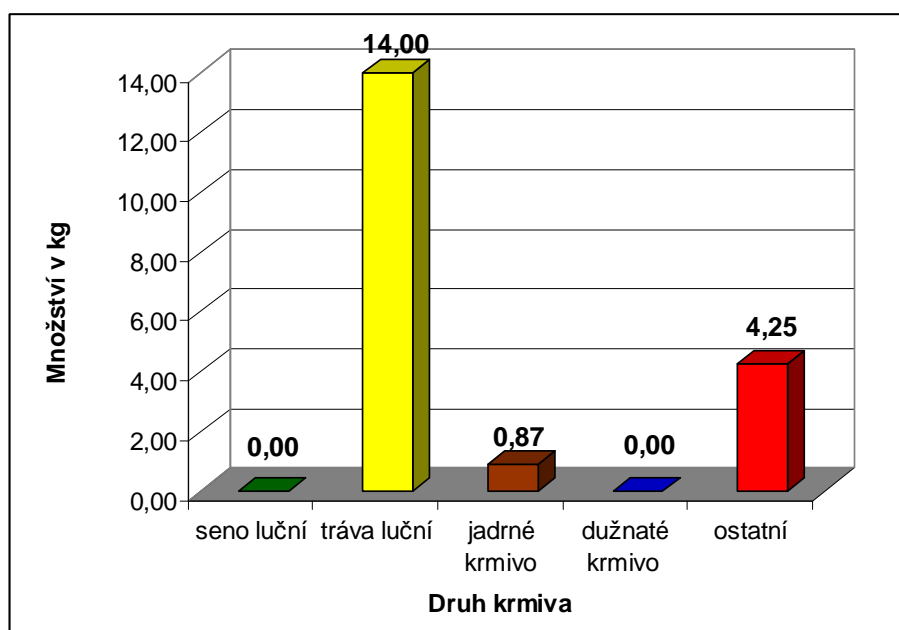
Vodu nepovažujeme za krmivo, ale je zcela základní složkou potravy každého živočicha. Tvoří prostředí pro všechny chemické reakce, při kterých se přeměňují látky a je

pro organismus nepostradatelná. Proto je důležité zajistit pro zvěř dostatečné množství kvalitní vody. Zvěř ji v přírodě přijímá prostřednictvím krmiv s poměrně malým obsahem sušiny a zbylou část z vodotečí a jezírek (VACH A KOL. 1996). V případě, že není možnost zajištění vody z přírodních zdrojů, je možné ji zajistit pomocí napajedel (ZABLOUDIL & VALA 2009).

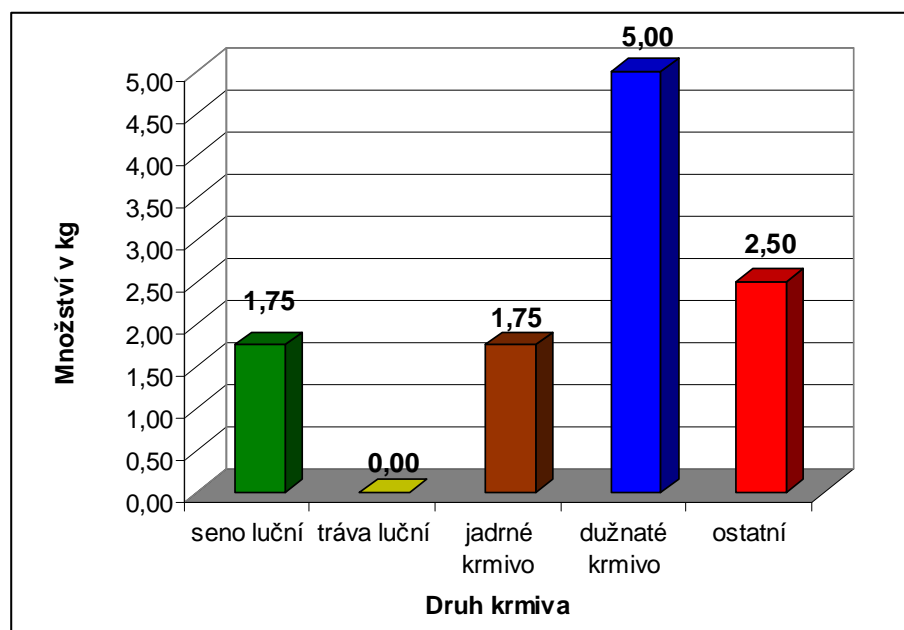
3.2.1.6 Průměrné složení potravy jelení zvěře

Složení potravy jelení zvěře se v průběhu roku velice liší. Jedná se především o střídání klimatických faktorů, věku zvěře, pohlaví, druhu předkládané potravy, rušení zvěře, zdravotního stavu a kvalitě předkládané potravy.

Graf č. 1: Průměrné složení potravy jelena lesního v letním období
(ZABLOUDIL & VALA 2009)



Graf č. 2: Průměrné složení potravy jelena lesního v zimním období
(ZABLOUDIL & VALA 2009)



3.2.2 Význam struktury a složení krmiv pro jelení zvěř

Životní podmínky jelení zvěře byly v posledních 50 letech v České republice činností člověka výrazně změněny. Původní lesní porosty a lužní lesy byly ve většině oblastí nahrazeny smrkovými lesy nebo zcela ustoupily intenzivní zemědělské výrobě nerespektující potřebu zvěře ani krajiny. Úživnost životního prostředí se výrazně zhoršila. V souvislosti s tím se změnil i biotop jelení zvěře, dnes převážně vytlačené do smrkových lesů v oblastech s vyšší nadmořskou výškou. Pro správnou výživu jelení zvěře jsou nenahraditelné lesní pastviny, louky a světliny, jejich výměra však také prudce poklesla. Snaha o kompenzování těchto deficitů 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. Tento způsob péče 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 alespoň 8 mm, která je štěpena celulolytickými bakteriemi (HINTNAUS 2011). Mechanické vlastnosti hrubé vlákniny musí umožnit přežvykování. K tomuto fyziologickému nezastupitelnému procesu potřebuje zvěř dostatek

klidu. Celulóza je pro jelení zvěř nezbytnou složkou potravy, která udržuje při životě a v činnosti celulolytické bakterie a prvoky a umožňuje z vlákniny uvolnit dostatečné množství energie ve formě těkavých mastných kyselin. Minimum hrubé vlákniny v zažitém bachoru je odhadováno celoročně na 50 % sušiny (HINTNAUS 2000).

V případě, že není zajištěno dostatečné množství krmiv s vysokým obsahem celulózy, dochází k hladovění, zvěř začne hledat náhradní zdroje vlákniny a může docházet k poškození porostů loupáním, případně okusem nebo ohryzem kůry. Předložená práce si klade za cíl napomoci osvětlit některé stránky fyziologie trávení u jelena v nových podmínkách jeho chovu.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Komerční kity

Kity uvedené v tabulce č. 1 byly použity pro izolaci DNA z bacheru a exkrementů, pro purifikaci DNA fragmentů po PCR reakci a pro sekvenační reakci.

Tab. č. 1: Seznam použitých kitů pro práci s DNA

Funkce	Název	Výrobce
Izolace DNA	ZR Fecal DNA Kit TM	Zymo Research
Přečišťování PCR produktů	QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Sekvenování fragmentů 16 S rDNA	BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Biosystems

4.1.2 PCR primery

Seznam specifických primerů použitých při PCR v této práci je v tabulce č. 2.

Tab. č. 2: Seznam použitých primerů použitých při PCR reakci

Označení	Sekvence (5 – 3)	Zdroj
338 GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCG CCG CCG CAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG	MUYZER A KOL. 1993
FP 341	CCT ACG GGA GGC AGC AC	MUYZER A KOL. 1993
RP 534	ATT ACC GCG GCT GCT GG	MUYZER A KOL. 1993

4.1.3 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	

4.1.4 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 ohřívač 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 nádrž Protean II xi Cell, Biorad (USA)
Water Purification System Direct – Q_{uv3}, Millipore (USA)

4.2 Odběr vzorků a zpracování vzorků

Vzorky byly odebírány v dvou lokalitách: ve volném chovu v oblasti Strážného na Šumavě a v oboře Aglája nedaleko Dobříše. Vzorky byly dvojího typu. Jeden typ vzorku byl odebírán z bachorů střelených jelenů v období lovu od 15.11. 2010 do 15.1. 2011 v době vegetačního klidu dřevin a bylo jich 21 nasbíráno ve volném chovu zvěře a 15 v oborním chovu. Druhý typ vzorků byly exkrementy jelenů nasbírané 15. ledna 2011. Trus byl nasbírán v okolí krmících zařízení. Ve volnosti jich bylo nasbíráno 19 a v oborním chovu 12. Vzorky byly odebírány do sterilních plastových vzorkovnic o objemu 25 ml a byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -10 °C.

Tab. č. 3: Seznam a označení jednotlivých vzorků

Pořadí	Označení	Pohlaví	Stáří	Druh vzorku	Místo sběru
1	1	kolouch	1	bachor	volnost
2	2	laň	5	bachor	volnost
3	3	kolouch	1	bachor	volnost
4	4	kolouch	1	bachor	volnost
5	5	laň	3	bachor	volnost
6	6	laň	3	bachor	volnost
7	7	jelen	4	bachor	volnost
8	8	laň	3	bachor	volnost
9	9	laň	2	bachor	volnost
10	10	kolouch	1	bachor	volnost
11	11	laň	3	bachor	volnost
12	12	kolouch	1	bachor	volnost
13	13	laň	6	bachor	volnost
14	14	jelen	3	bachor	volnost
15	15	kolouch	1	bachor	volnost
16	16	kolouch	1	bachor	volnost
17	17	laň	5	bachor	volnost
18	18	kolouch	1	bachor	volnost
19	19	laň	3	bachor	volnost
20	20	kolouch	1	bachor	volnost
21	21	laň	2	bachor	volnost
22	23	kolouch	-	exkrementy	volnost
23	24	kolouch	-	exkrementy	volnost
24	25	kolouch	-	exkrementy	volnost
25	26	kolouch	-	exkrementy	volnost
26	27	kolouch	-	exkrementy	volnost
27	28	laň	-	exkrementy	volnost
28	29	laň	-	exkrementy	volnost
29	30	laň	-	exkrementy	volnost
30	31	laň	-	exkrementy	volnost
31	32	laň	-	exkrementy	volnost
32	33	laň	-	exkrementy	volnost
33	34	jelen	-	exkrementy	volnost

34	35	jelen	-	exkrementy	volnost
35	36	jelen	-	exkrementy	volnost
36	37	jelen	-	exkrementy	volnost
37	51	kolouch	1	bachor	obora
38	52	jelen	3	bachor	obora
39	53	jelen	7	bachor	obora
40	54	kolouch	1	bachor	obora
41	55	laň	5	bachor	obora
42	56	kolouch	1	bachor	obora
43	57	kolouch	1	bachor	obora
44	58	jelen	2	bachor	obora
45	59	kolouch	1	bachor	obora
46	60	kolouch	1	bachor	obora
47	61	jelen	2	bachor	obora
48	62	jelen	10	bachor	obora
49	63	laň	5	bachor	obora
50	64	laň	6	bachor	obora
51	65	laň	4	bachor	obora
52	67	jelen	-	exkrementy	obora
53	68	jelen	-	exkrementy	obora
54	69	jelen	-	exkrementy	obora
55	70	laň	-	exkrementy	obora
56	71	kolouch	-	exkrementy	obora
57	72	laň	-	exkrementy	obora
58	73	laň	-	exkrementy	obora
59	74	kolouch	-	exkrementy	obora
60	75	laň	-	exkrementy	obora
61	76	jelen	-	exkrementy	obora
62	77	kolouch	-	exkrementy	obora
63	78	kolouch	-	exkrementy	obora

4.2.1 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

krmiv. Do těchto krmiv, která jsou předkládána zvěři patří seno, vojtěška, ječnem, oves, krmná řepa a mrkev.

4.2.2 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 krmiv. Nejčastěji předladaná krmiva jsou seno, vojtěška, ječmen, oves, pšenice, řepkové pokrutiny a krmná řepa.

4.3 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí komerčního kitu ZR Fecal DNA KitTM dle návodu výrobce. Principem izolace byl rozklad buněk v lyzačním pufu, zachycení uvolněné DNA na filtru dodávané kolonky, promytí roztokem obsahující etanol a eluce DNA.

Koncentrace a čistota získané DNA byla kontrolována vizuálně pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Gel na elektroforézu byl připraven jako 1,2 % roztok agarózy v TBE pufu. Vzorky byly na gel dávkovány ve směsi se vzorkovým pufem v poměru 2:1 (SAMBROOK A KOL. 1989).

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
Forvard primer 338 GC	1 µl
Revers primer RP 534	1 µl
PCR readymix	15 µl
PCR H ₂ O	12 µl

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).

Obr. 6: Box s UV světlem (orig. ŠIMŮNEK 2011)



4.5 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 (MYERS A KOL. 1985).

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 č. 4. 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.

Obr. 7: DGGE, gel se vzorky na korpusu, který je ponořen temperované lázně (orig. ŠIMŮNEK, 2011)



Tab. č. 4: 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

4.6 Sekvenování

Vybrané fragmenty DNA byly identifikovány následujícím způsobem: DNA byla vyříznuta z gelu sterilním skalpelem, bylo přidáno 100 μl dH₂O a směs byla centrifugována 10 minut při 9000 otáčkách a pokojové teplotě.

Jeden mikrolitr roztoku obsahující fragmenty gelu byl amplifikován způsobem popsaným výše (amplifikace úseku 16S rDNA) a následující modifikací: forward primer 338 GC byl nahrazen primerem FP 341. Získaný produkt byl přečištěn kitem QIAquick PCR Purification Kit. Cílem purifikace bylo odstranění templátové genomické DNA a obou primerů, které by interferovaly při následném sekvenování. Byla provedena kontrola čistoty, formy a koncentrace DNA pomocí elektroforézy v agarozovém gelu. Sekvenování bylo provedeno pomocí kitu BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit dle návodu výrobce. Reakční směs obsahovala:

PCR produkt	1 μl
Primer 10 mM	0,32 μl
5x sekvenčního pufru	4 μl
2,5x směs BigDye	2 μl
PCR H ₂ O	12,68 μl

Sekvenační reakce probíhala v termocykleru podle následujícího programu: denaturace 1 minutu při 96 °C a 25 amplifikačních cyklů (10 sec při 94 °C, 5 sec při 50 °C

a 4 minuty při 60 °C). Sekvenační produkty byly přečištěny srážením etanolem. Ke 20 μ l reakční směsi byly přidány 2 μ l 125 mM EDTA, 2 μ l 3 M NaAc a 50 μ l etanolu. Směs byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě a odstředěna 35 minut při 16 400 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a DNA promyta 70 μ l 70 % etanolu. Sekvenační fragmenty byly rozpuštěny v 10 μ l formamidu HiDi a analyzovány na přístroji 3100 – Avant Genetic analyse. Získané sekvence byly porovnány s NCBI Blast databází (MAIDAK A KOL. 1994).

Obr. 8: Termocykler (orig. ŠIMŮNEK 2011)



4.7 Příprava agarózového gelu a podmínky elektroforézy

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 A KOL. 1982). Elektroforéza probíhala 1 hodinu při napěťové spádu 8 – 10 $v \cdot cm^{-1}$. Po skončení byla DNA barvena etidium bromidem o koncentraci 0,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ (SAMBROOK A KOL. 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.

4.8 Konstrukce fylogenetického stromu

Fylogenetický strom je grafické znázornění příbuzenských vztahů mezi různými taxonomickými jednotkami, u kterých lze předpokládat, že mají společného předka. Příbuzenské vztahy se posuzují na základě morfologické nebo genetické podobnosti.

Metoda je založena na vytvoření binární matice (0 chybí a 1 zastoupena) v programu MsExcel 2007 z DNA DGGE gelu vizualizované a dokumentované ve fotodokumentačním systému GelDocTM XR^T (Bio-Rad). Tato matice se vloží do softwaru FreeTree (HAMPL A KOL. 2001) a podle metody Neighbour-joining Jaccard software vypočítá vzdálenost a vytvoří fylogenetický strom, jehož věrohodnost se ověří metodou bootstrapping (1000 krát). Tato metoda ověří věrohodnost fylogenetického stromu, vyjádřenou v procentech u každé větve stromu (HAMPL A KOL. 2001).

4.9 Real-time PCR

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 A KOL. 1996).

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

DNA	1 µl
Primer forward 10 mM	1 µl
Primer revers 10 mM	1 µl
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) Mix	10 µl

PCR H₂O

7 µl

Byla použita jedna z následující dvojice primerů: Uni331F + Uni797R; Bac303F + Bac708R; Cl.leptumF113 + Cl.leptumR1367; Eco1457F + Eco1652R; Dsv691F + Dsv826R; Eco1457F + Eco1652R; Asp-F + ITS-R; Lm26-F + Lm3-R. Jejich sekvence uvádí tabulka č. 5. Pro qPCR byl použit jeden z teplotních programů uvedených v seznamu.

Tab. č. 5: Primery použité při Real-time PCR

Označení	Sekvence (5-3)	Zdroj
Uni331F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	BARTOSCH 2004
Uni 797R	GGACTACCAGGGTATCTATCCTGTT	BARTOSCH 2004
Bac303F	GAAGGTCCCCCACATTG	BARTOSCH 2004
Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	BARTOSCH 2004
Cl.leptumF1123	GTTGACAAAACGGAGGAAGG	KVERKA OS. KONZULTACE
Cl. leptumR1367	GACGGGCGGTGTGTACAA	KVERKA, OS. KONZULTACE
Dsv691F	CCGTAGATATCTGGAGGAACATCAG	BARTOSCH 2004
Dsv826R	ACATCTAGCATCCATCGTTTACAGC	BARTOSCH 2004
Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	BARTOSCH 2004
Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	BARTOSCH 2004
Asp-F	CTGTTTCGAGCGTCATTG	SCHABEREITER- GURTNER 2007
ITS-R	TCCTCCGCTTATTGATAT	SCHABEREITER- GURTNER 2007
Lm26-F	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG	KAUFMANN A KOL. 1997
Lm3-R	CGG GTG CTI CCC ACT TTC ATG	KAUFMANN A KOL. 1997

4.9.1 Seznam teplotních profilů pro qPCR

Celkové bakterie (Eubakterie)

Primery Uni331F + Uni797R: denaturace 3 minuty při 95 °C, 35 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 95 °C, 30 sec přisednutí primerů při 58 °C a 30 sec polymerace při 72 °C).

Bakteroides (Bacter/Porphyrom/Prevotella)

Primery Bac303F + Bac708R: denaturace 3 minuty při 94 °C, 35 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 94 °C, 30 sec přisednutí primerů při 56 °C a 30 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (5 min při 72 °C, 30 sec při 56 °C a 30 sec při 94 °C).

Clostridium leptum

Primery Cl.leptumF113 + Cl.leptumR1367: denaturace 4 minuty při 94 °C, 35 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 94 °C, 30 sec přisednutí primerů při 55 °C a 30 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (5 min při 72 °C, 30 sec při 55 °C a 30 sec při 94 °C).

Enterobakterie

Primery Eco1457F + Eco1652R: denaturace 3 minuty při 95 °C, 35 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 95 °C, 30 sec přisednutí primerů při 63 °C a 30 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (1 min při 95 °C, 30 sec při 63 °C a 30 sec při 95 °C).

Desulfovibrio

Primery Dsv691F + Dsv826R: denaturace 3 minuty při 94 °C, 35 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 94 °C, 30 sec přisednutí primerů při 55 °C a 30 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (5 min při 72 °C, 30 sec při 55 °C a 30 sec při 94 °C).

Aspergillus niger

Primery Asp-F + ITS-R: denaturace 3 minuty při 94 °C, 40 amplifikačních cyklů (30 sec denaturace při 94 °C, 35 sec přisednutí primerů při 55 °C a 30 sec polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (15 sec při 95 °C, 10 sec při 55 °C a 10 sec při 95 °C).

Bifidobacterium breve

Primery Lm26-F + Lm3-R: denaturace 5 minut při 94 °C, 8 amplifikačních cyklů (45 sec denaturace při 94 °C, 2 min přisednutí primerů při 55 °C a 1 min polymerace při 72

°C), 30 amplifikačních cyklů (20 sec denaturace při 94 °C, 1min přisednutí primerů při 55 °C a 1 min polymerace při 72 °C) a závěrečná elongace (7min při 72 °C, 30 sec při 55 °C a 30 sec při 95 °C).

4.9.2 Statistické zhodnocení

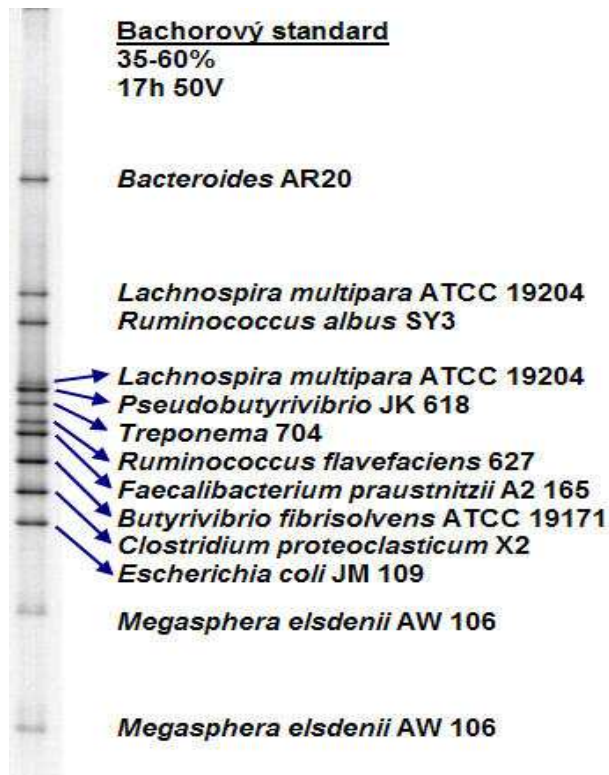
Výsledky měření jsou vyjadřovány jako průměry a směrodatné odchylky hodnot výběru o četnosti n=12, 12 pro skupiny Bachor volnost, Bachor obora, Exkrementy volnost, Exkrementy obora. Významnost rozdílů mezi hodnotami byla analyzována pomocí jednocestné ANOVA metody (ODA A KOL. 1991). V případě signifikantního rozdílu byl proveden Studentův T-TEST (SNEDECOR & COCHRAN 1967). Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad Prism v. 5.04 (GraphPad Software, USA).

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Charakteristika mikroorganismů v trávicím traktu

Pro charakteristiku mikroorganismů v trávicím traktu jelena evropského byly analyzovány vzorky odebrané z bachoru a ze stolice ze dvou lokalit. Z lokality volného chovu a chovu oborního. Z těchto vzorků byla izolována DNA, která byla v dalších krocích dvakrát amplifikována V3 oblast 16 S rDNA použitím univerzálních bakteriálních primerů. Amplifikované oblasti 16 S rDNA byly rozděleny pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy DGGE. Jednotlivé fragmenty DNA reprezentující jednotlivé bakteriální druhy byly následně vyříznuty z gelu a sekvenovány. Před sekvencí byla ověřena čistota DNA pomocí agarózové elektrofozéry. Získané sekvence DNA byly poté manuálně upraveny pomocí softwaru BioEdit a porovnány s uloženými sekvencemi v databázi GenBank. Získané profily DGGE jsou znárodněny na obrázcích a výsledné sekvence získané porovnáním jsou uvedeny v tabulkách č. 6 – 9.

Obr. 9: Použitý bachorový standard při DGGE metodě



5.1.1 Bakteriální druhy u jelenů z divokého chovu ze vzorků z bachoru

V této fázi pokusu byly stanoveny bakteriální druhy u jelenů z divokého chovu ze vzorků odebraných z bachoru. V této části pokusu byly analyzovány vzorky č. 1 – 21. Na obr. je zobrazen DGGE profil celkové bakteriální populace a v tabulce č. 6 jsou zachyceny výsledky získaných sekvencí vybraných vyřezaných fragmentů z gelu a porovnány se sekvencemi v databázi GenBank.

Z těchto výsledků vyplývá, že některé bakteriální druhy se vyskytují u více zvířat. Jde o nekultivované bachorové bakterie (fragmenty 1, 13, 14 a 15) a nekultivované bakterie (fragmenty 2, 3, 6, 7, 8, 9, 16), které se vyskytují u všech analyzovaných vzorků, tudíž u všech jelenů z této skupiny.

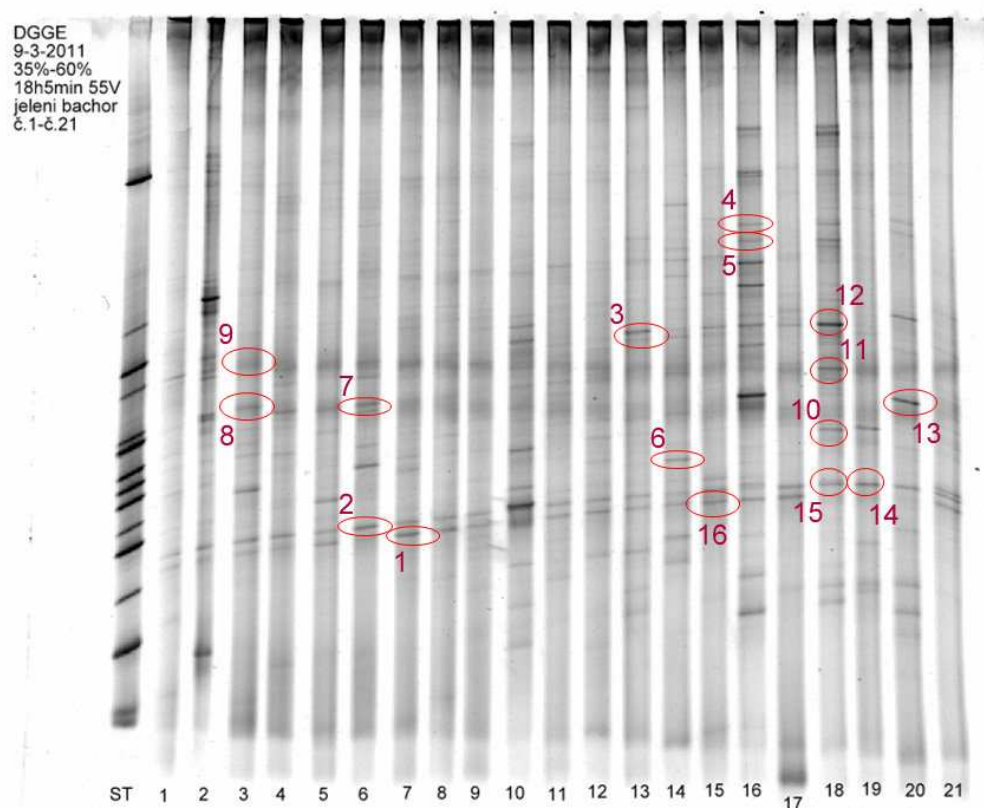
Druh *Pseudomonas aeruginosa* (fragment 4, 5) se vyskytuje u jelenů 16 a 18. Tento druh je popsán jako patogen, který se vyskytuje v odpadních vodách, v půdě a ve stolici domácích i divokých zvířat. Kolonizuje sliznice respiračního a močového ústrojí se sníženou imunitou (VAŘEJKA A KOL. 1989). Podle této charakteristiky můžeme konstatovat, že tento tato bakterie osidluje trávicí trakt vlivem požití nekvalitní vody či potravy, což je volném chovu běžná záležitost.

Dalším druhem identifikované nekultivované bakterie je rod *Bacteroides* (fragment 10) vyskytující se u jelenů 18 a 19. Tento druh je popsán jako anaerobní rod, který je běžný jako součást mikroflóry zvířat i člověka. Mezi jeho základní činnosti patří fermentace za vzniku kyseliny octové a mléčné (KITAHARA A KOL. 2005).

Druh *Pseudomonas veronii* (fragment 11) byl identifikován u jelenů 14, 18, 19. Tento druh byl identifikován ve vzorcích půdy na bývalých skládkách, kde dochází k rozkladům tlejícího dřeva (NAM A KOL. 2003). Tento druh bakterie se mohl dostat do trávicího traktu jelenů vlivem požití rozkládajícího se dřeva.

Posledním druhem identifikovaného v této skupině vzorků je nekultivovaný řád *Pseudomonadales* (fragment 12), vyskytující se u jelenů 13, 15, 16, 17 a 18.

Obr. 10: DGGE profil celkové bakteriální populace u jelenů 1 – 21 (bachor)



Tab. č. 6: Výsledky zjištěné porovnáním získaných sekvencí se sekvencemi z databáze GenBank

Fragment	Nejbližší nalezená sekvence v GenBank	Podobnost
1	Nekultivovaná bachorová bakterie	94 %
2	Nekultivovaná bakterie	95 %
3	Nekultivovaná bakterie	94 %
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97 %
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98 %
6	Nekultivovaná bakterie	93 %
7	Nekultivovaná bakterie	94 %
8	Nekultivovaná bakterie	93 %
9	Nekultivovaná bakterie	92 %
10	Nekultivovaná bakterie rodu <i>Bacteroides</i>	96 %
11	<i>Pseudomonas veronii</i>	97 %

12	Nekultivovaná bakterie řádu <i>Pseudomonadales</i>	98 %
13	Nekultivovaná bachorová bakterie	98 %
14	Nekultivovaná bachorová bakterie	95 %
15	Nekultivovaná bachorová bakterie	95 %
16	Nekultivovaná bakterie	94 %

5.1.1.1 Získané sekvence

Sekvence č. 1

GGGGNGGAACCTGACAGCACGCCGCGTGAAGAGAGGCCTTCGGGTTGTAACCTT
CTTTTATGAGGGACGAAGGACGTGACGGTACCTCATGAATAGCCAGCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGCCAGCAGCCGCGGTAAT

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 114/121 (94 %)

Sekvence č. 2

ANCTGACAGCACGCCGCGTGAAGAGAAGGCTTCGGGTTGTAACTCTTTATGA
GGGACGAAGACGTGACGGTACCTCATGAATAAGCCACGCGCTAACTACGTGCC
TCCGCCGCGGCAAGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 97/102 (95 %)

Sekvence č. 3

GNCGTGGAGGAGACGGTTTTTCGGATTGTAAGCTCTTTTATAGGGACGAACTAA
GACGGCACCTTATGAAAAGCTCCGACCATATCCATGCAATCCGCCTAGGTNAA
TATGTGCCCCGAGGCAATATAATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 74/79 (94 %)

Sekvence č. 4

GAAAGGGGGA ACTGACCAGCCATGCCGCGTGTGTGAGAGGTCTTCGGATTGTA
AAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTCTTGAC
GTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTATGCCAGCAGCCGCGGTAAT

Pseudomonas aeruginosa

Identita = 145/149 (97 %)

Sekvence č. 5

GAAAGGGGGA ACTGACCAGCCATGCCGCGTGTGTGAGAGGTCTTCGGATTGTAA
AGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTCTTGACG
TTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Pseudomonas aeruginosa

Identita = 147/150 (98 %)

Sekvence č. 6

GGAGGGGGG GAAACCTGAGCAGCGAGCCGCGTGAGGAAGAAGTTTTTCGGTTG
TAAGCTCTATCAGCAGGGAATAAAATGACGGTACCTGACTAAGAATGCCCCGC
TAAATACGTGCCATCACCCGCGGTTCAATGCCAGCAGCCGCGGTAAT

Nekultivovaná bakterie

Identita = 123/132 (93 %)

Sekvence č. 7

ACCTGACCAGCACGCCGCGTGAGGGAGAAGGCCCTCGGGTTGTAACTCTTTT
AGCAGGGACGAATGNNGGGCGCGTCTTCCGAAGTGCTGCCCTACGATAGGCA
TCGGCTAACTTAATGCCAGCAGCCGCGGTAATAAAAT

Nekultivovaná bakterie

Identita = 64/68 (94 %)

Sekvence č. 8

GGGGGGCACCTGACCAGCCATGCCGCGTGATGAGAAGCCTTCGGGTTGTAAGC
TCTTTTTCGGGAGAAAAGGGGTACCTGNCTAGAAATGCCCGCCCCTACGTGCC
GGATCGGCTGTTTAAAAACAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 123/134 (93 %)

Sekvence č. 9

GGNNNNNANCTGACCAGCACGCCGCGTGAGGATAGGCCCTCGGGTTGTAAAC
TCTTTTATACGGGAAATGTATCTACGTGTAGATATTTGACGTACCGTACGAATA
AGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 134/145 (92 %)

Sekvence č. 10

GGGGGGGGAAACCCTGAACCAGCCAGCCGCGTGCAGGAGACGGCCTTCGGGT
TGTAAACTCTTTTATCAGGCGGGGAATGCACAAGATGCGTCTTGTGCTTGACA
GTACCTGATGAATAAGCACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie rodu *Bacteroides*

Identita = 151/157 (96 %)

Sekvence č. 11

ACCTGACCAGCCATGCCGCGTGTGTGAGAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTT
AAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTTTTGACGTTACCGAC
AGAATAAGCACCGGCTACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA

Pseudomonas veronii

Identita = 148/152 (97 %)

Sekvence č. 12

AGCTGACCAGCCATGCCGCGTGAGTGAGAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTT
TAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGA
CAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie řádu *Pseudomonadales*

Identita = 147/150 (98 %)

Sekvence č. 13

AACTGANCAGCNAGTAGCGTGCAGGAGAGGCCCTATGGGTTGTAAACTGC
TTTTATACGGGGATAAAGTGAGGGACGTGTCCCTTTTTGTAGGTACCGTATGAA
TAAGGACCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATNA

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 130/132 (98 %)

Sekvence č. 14

AAACTGACAGCACGCCGCGTGAAGGAGAAGGTCTTCGGATTGGAACCTC
TTTTATGACGGACGAAAGACGTGACGGTTCCTCATGAATAGCCCGCGGCTAAC
TACGTGCCCCGGCCGCTGTAATACCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 115/121 (95 %)

Sekvence č. 15

CTGACCAGCACGCCGCGTGAGGAGAGGCCTTCGGGTTGTAACTTCTTTTATGA
GGGACGAAGGACGTGACGGTACCTCATGAATAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAAACCTGCCCCGCGGTAATAAATAA

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 120/126 (95 %)

Sekvence č. 16

AAACTGACCAGCACGCCGCGTGAAGGAGAAGGCCTTCGGGTTGGAAACCTCT
TTTATGAGGGACGAAAAANGTGTCTCTAGCTCATGAATGCCCNCCGCTAACTA
CATGCCNCGGCCGCTCTAAACCAGCAGCCGCGGTAAT

Nekultivovaná bakterie

Identita = 136/145 (94 %)

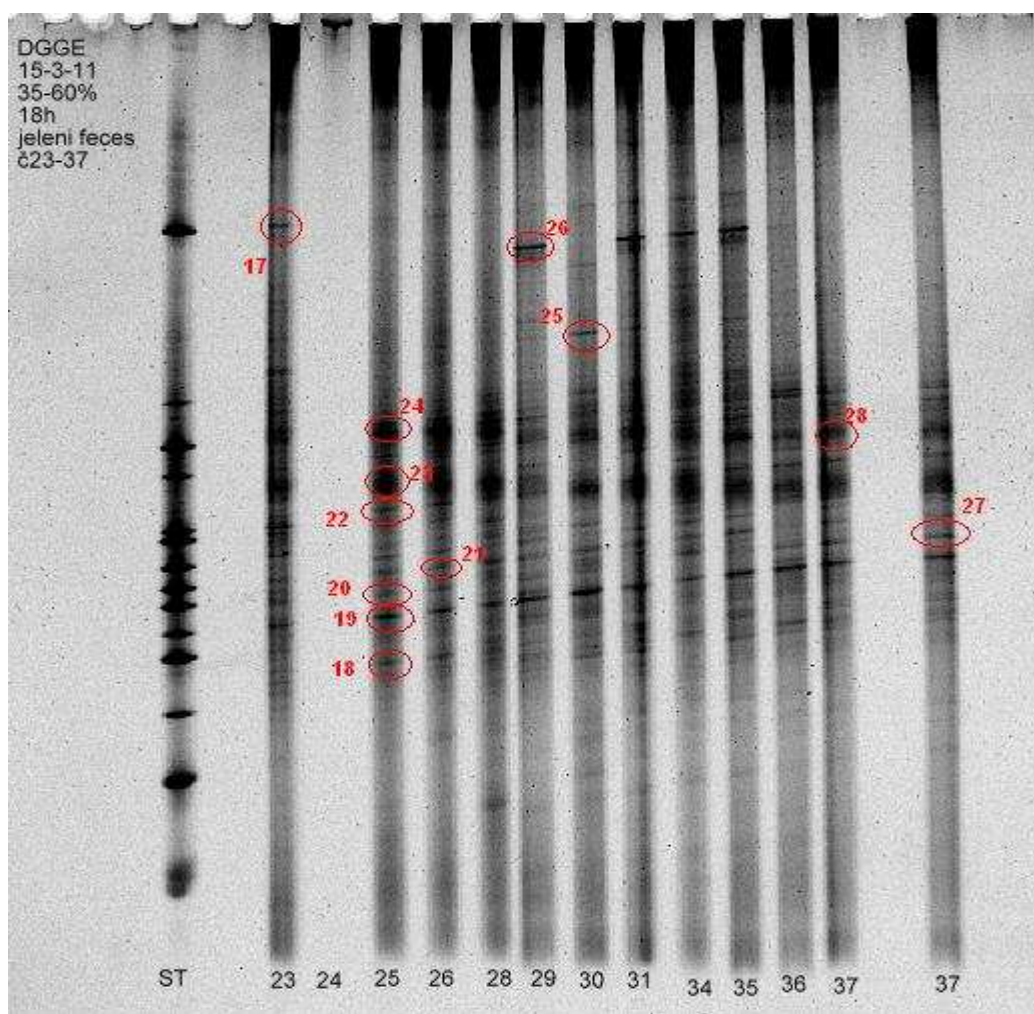
5.1.2 Bakteriální druhy u jelenů z divokého chovu ze vzorků ze stolice

Pro charakteristiku bakteriální populace jelenů z divokého chovu byly vzorky odebírány ze stolice. Profil DGGE celkové bakteriální populace je na obrázku č. 11 a výsledky získané porovnáním jednotlivých sekvencí v databázi GenBank jsou v tabulce č. 7.

Z profilu DGGE vyplývá, že některé druhy bakterií jsou zastoupeny u všech zvířat. Jedná se o nekultivovanou bakterii (fragment 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28).

Posledním identifikovaným druhem v této skupině vzorků je nekultivovaný zástupce rodu *Bacteroides* (fragment 24, 26) vyskytující se u jelenů 25, 29, 31, 34, 35, 36 a 37.

Obr. 11: DGGE profil celkové bakteriální populace u jelenů 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37 (exkrementy)



Tab. č. 7: Výsledky zjištěné porovnáním získaných sekvencí se sekvencemi z databáze GenBank

Fragment	Nejbližší nalezená sekvence v GenBank	Podobnost
17	Nekultivovaná bakterie	95 %
18	Nekultivovaná bakterie	92 %
19	Nekultivovaná bakterie	96 %
20	Nekultivovaná bakterie	95 %
21	Nekultivovaná bakterie	92 %
22	Nekultivovaná bakterie	96 %
23	Nekultivovaná bakterie	95 %
24	Nekultivovaná bakterie rodu <i>Bacteroides</i>	94 %
25	Nekultivovaná bakterie	94 %
26	Nekultivovaná bakterie rodu <i>Bacteroides</i>	93 %
27	Nekultivovaná bakterie	96 %
28	Nekultivovaná bakterie	93 %

5.1.2.1 Získané sekvence

Sekvence č. 17

AACTGACCCGCACGCCGCGTGAGGGAGAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTT
 TTAGGGAGGAAAAGGCGGTACCCGTATGAGATTGCAGGGACCCTAAGAATAA
 GGCTCGGCTAATTCCGAGCCAGCAGCCGCGGTA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 124/130 (95 %)

Sekvence č. 18

AAACCTGACCCAGCACGCCGCGTGAGAGAGGCTTTCGGNTTGTAACCTCTTTTT
 TCCGGACGAANANGGCGGCGCTCCCTGCNGAAAAACCGGCTGCTAACTAGNT
 GCCAGCGGCCGCGGAAAAACA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 49/51 (96 %)

Sekvence č. 19

AACCTGACCAGCCACGCCGCGTGAGGAGAGGATTTTCGGGTGGTAACCTCTTTT
TGAGGGAAGAAAATGACGGTACGTGACTAAGATTGCCGGCTAATACGAGCCG
GCCGCCGCGGTTTACGAGCAGCCGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 128/134 (96 %)

Sekvence č. 20

AAACTGACCAGCACGCCGCGTGAGGAAGACGGTTTCGGGTGTAACCTCTTTTT
GAGGGAAGAAAATGACGGTACGTGACTAAGATTGCCGGCTAACTACGAGCCG
GCCGCCGCGGCTTTAAGAGCAGCCGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 127/133 (95 %)

Sekvence č. 21

AAACCGGAACCAGCGACGCCGCGTGAGGAGAAGGCTTTCGGGTGTAACCTC
TTTTTCCCCCTTTAAAANGACGGCACCTGACGCNGANTGCCGGCCCCCTAACGA
GACGCCACCCGCGGCAATAAAACAGCAGCCGCGGTAAAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 46/46 (100 %)

Sekvence č. 22

ACCGGACCAGCACGCCGCGTGAAGGAGAGGCCTTCGGGTGTAACCTCTTTTA
CCCCTTGAAAAAGGCGCCGGTGCGGAGANGACCGGCCTTACGAGACGCCCGG
CGGCGCTAATCCGCCGCCCGGGAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 49/51 (96 %)

Sekvence č. 23

AAGCCTGACCAGCACGCCGCGTGAGGGATAGGCTTTCGGGTTGTAAACCTCTT
TCAGCAGGGAAGAAAAGACGGTACCTGCAGAAGAATACCGGCTCATACTAA
CGCCTCCCCTAGCTCNAAAACAGCAGCCGCGGTAAT

Nekultivovaná bakterie

Identita = 88/93 (95 %)

Sekvence č. 24

AACCTGACCAACACGCCGCGTGAGGAGAGGCTTTCGGATGTAACTCTTTTTTC
AGGGAAGAAAAAGGCGCTACCTGTAGCAGATTGCCGTCCCATATGAATAAGC
ATCGGCTAACTCCATGCCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bakterie rodu *Bacteroides*

Identita = 48/48 (100 %)

Sekvence č. 25

AACAGACCAGCACGCCGCGTGAGGAGAAGGCCCTCGGGTTGAACTTCTTTTT
ATACGGAAGTAAAGTGCCTTACGTGTAGGGTTTTGTATGTACCGTATGAATAG
CATCGGCTAATCCAGGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 133/142 (94 %)

Sekvence č. 26

ACCTGACCAGCCATGCCGCGTGCAGGAGAGGCCCTATGGGTTGTNAACTGC
TTTTATATGGGAGCAATAATAGGTTTGCGTAGACCGATGCAAGTACCATATGA
ATAAGCATCGGCTAACTCCATGCCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bakterie rodu *Bacteroides*

Identita = 139/149 (93 %)

Sekvence č. 27

AACTGNACCAGCGACGCCGCGTGAGGTGAGGCTTCCGGATGTAAAGCTCTTTT
TCAGGGAAGAAAAGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACTTGCCA
GCCGCCGCGGTAATGTACCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 127/132 (96 %)

Sekvence č. 28

AACTGACCAGCACGCCGCGTGAGGAGAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTAT
CAGGGAGAAATGACGGTACCTGATGAATAAGTCCGGCTAATACGTGCCAGCA
GCCGCCGTTCAAACCACCCGCGGAATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 107/115 (93 %)

5.1.3 Bakteriální druhy u jelenů z oborního chovu ze vzorků z bachoru

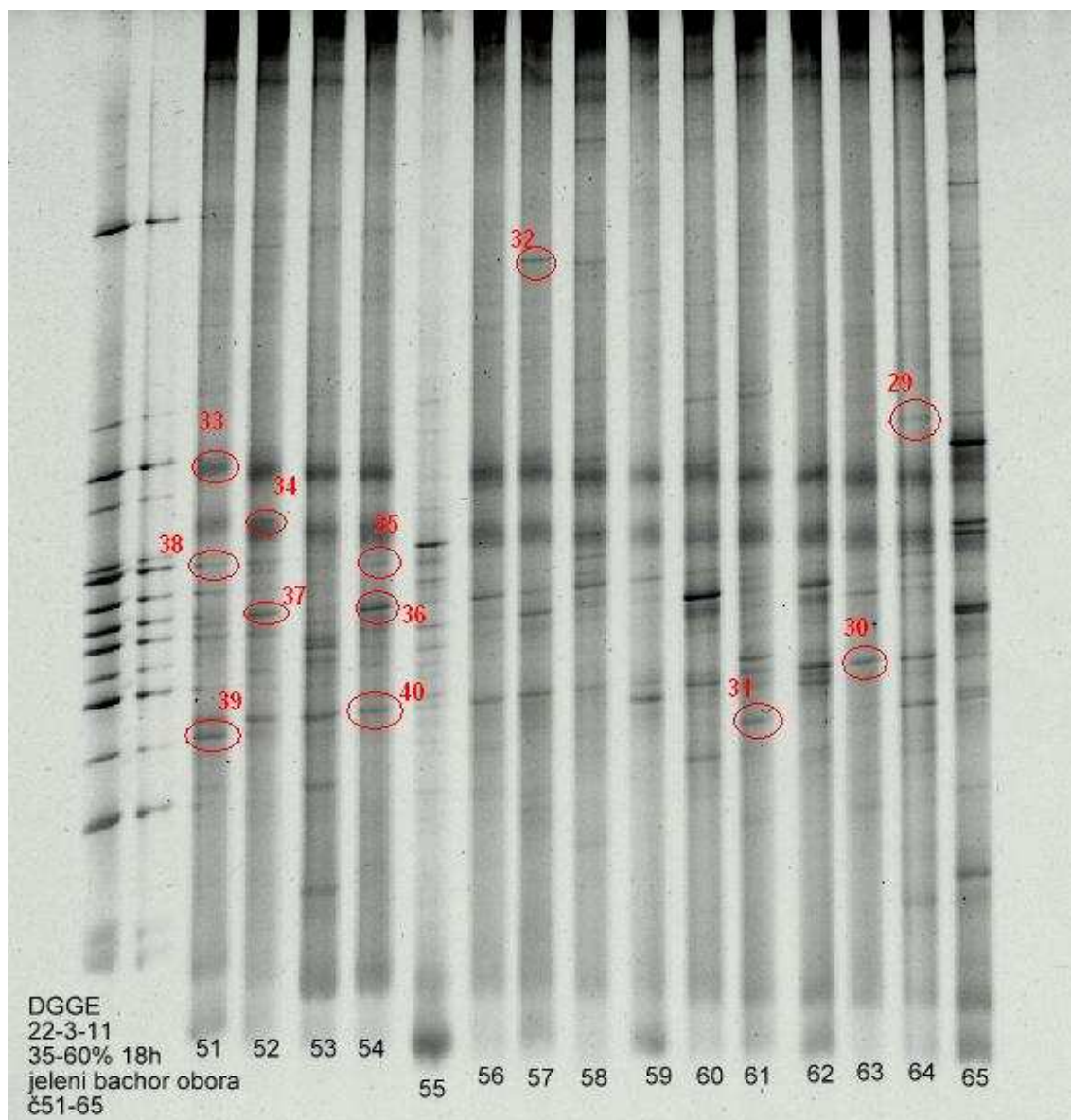
Obr. vyjadřuje DGGE profil celkové bakteriální populace u jelenů 51 – 65 z oborního chovu. Vzorky byly odebrány z bachoru ulovených jelenů. V tabulce č. 8 jsou výsledky získané porovnáním sekvencí jednotlivých vyřezaných fragmentů se sekvencemi v databázi GenBank.

Z výsledků vyplývá, že některé bakteriální druhy jsou zastoupeny u většiny zvířat. Nekultivovaná bakterie (fragment 29 – 34) a nekultivovaná bachorová bakterie (fragment 36, 38, 39 a 40) se byly identifikovány u všech jelenů.

Čeď *Ruminococcaceae* (fragment 37) byla identifikována u jelenů 51, 52, 58, 59 a 65.

Posledním druhem identifikovaným v těchto vzorcích je nekultivovaný rod *Bacteroides* (fragment 35) lokalizován u jelenů 52, 53, 54, 55 a 65. Tento rod je popisován jako anaerobní, který se vyskytuje u zvířat i u člověka. Jeho hlavní úlohou je fermentace za vzniku kyseliny octové a mléčné.

Obr. 12: DGGE profil celkové bakteriální populace u jelenů 51 – 65 (bachor)



Tab. č. 8: Výsledky zjištěné porovnáním získaných sekvencí se sekvencemi z databáze GenBank

Fragment	Nejbližší nalezená sekvence v GenBank	Podobnost
29	Nekultivovaná bakterie	96 %
30	Nekultivovaná bakterie	95 %
31	Nekultivovaná bakterie	95 %
32	Nekultivovaná bakterie	94 %
33	Nekultivovaná bakterie	96 %

34	Nekultivovaná bakterie	95 %
35	Nekultivovaná bakterie rodu <i>Bacteroides</i>	95 %
36	Nekultivovaná bachorová bakterie	95 %
37	Nekultivovaná bakterie čeledi <i>Ruminococcaceae</i>	96 %
38	Nekultivovaná bachorová bakterie	96 %
39	Nekultivovaná bachorová bakterie	96 %
40	Nekultivovaná bachorová bakterie	95 %

5.1.3.1 Získané sekvence

Sekvence č. 29

CCTGACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGAAGACGGCCCTATGGTTGTAAACTCTTT
TTATAGGGAAGTAAAGTGAGTCTCGTGAGACTTTTTGCATGTACCTTATGAATA
AGGACCGGCTAATTCCATGCCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 141/147 (96 %)

Sekvence č. 30

AACCTGGACCAGCAACGCCGCGTGAAGGAGAAGGTCTTCGGATTGTAAACTCT
TTTTTTNNGGANGAAAGACGTGGCGGTTGCTCATGAATGCCCCTGCCCTAACT
ACTATGCCTCNGCTGTTCTAATCCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 53/56 (95 %)

Sekvence č. 31

AAAGCCTGACCCAGCACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAACT
CTTTTCTTGGGGAAGAANAATGACGGTATCTGGGGAATAAGTCTCGGCTAACT
ATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 126/132 (95 %)

Sekvence č. 32

AACCTGACCAGCCACGCCGCGTGAGGGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCTCTT
TTGTTGAGGAGGAAAGAGGGCGGTACGTATGGACAGTTGCAGGGACCCTAAGA
ATAAGGCCCGGCTAATTCCGAGCCAGCCGCCGCGGTAATAAATAT

Nekultivovaná bakterie

Identita = 130/138 (94 %)

Sekvence č. 33

TAAAGGGNNNGNNAANCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGCAGGAAGACGGCCC
TCTGGGTTGTAAACTGCTTTTTTTCGGGAATAAAATGCGGCACGTGTGCCGCTT
TGCATGTACCGTANGAATAAGGACCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATAAATA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 141/147 (96 %)

Sekvence č. 34

GAGGGGNNGGAAACCTGACCAGCCACGCCGCGTGAAGGGAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAACCTCTTTTTGAGGGGAGGAAAGAGGCGGTACCCGTATAGAATTGCA
GGGCCCTAAGAATAAGGCCCGGCTAATTCCGAGCCAGCCGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 130/137 (95 %)

Sekvence č. 35

AACCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGAGAGGCCTTCTGGGTTGTAAACTCT
TTTCCGGGAAGAAAAGGGTGATGCGTCAACCGATTGACTGTCCTGAAGAATAA
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bakterie rodu *Bacteroides*

Identita = 138/146 (95 %)

Sekvence č. 36

GAAGGGGGGGGAAACCTGAGCAGCCATGCCGCGTGGAGGAGAGGTTTTTCGGA
TTGTAAACTCCTGTCTTAAAGGACGATAATGACGGTACTTTAGGAGGAACGTC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAGCCAGCAGCCGCGGTAATA

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 129/135 (95 %)

Sekvence č. 37

AAGGGGGGGGGAAACCTGAACCAGCAACGCCGCGTGAAGGGATGAGGCCTTC
GGGTTGTAAACCTCTGTCCTCTTTGAAGATAATGACGGTAGCAGAGGAGGAAN
GCCGGCCCTTTTGAAGACGGCACGGCTGGTTCTAANCCAGCAGCCGCGGTAAT
AA

Nekultivovaná bakterie čeledi *Ruminococcaceae*

Identita = 96/100 (96 %)

Sekvence č. 38

TAATGGGCGGGAGCCTGACCAGCAAGTAGCGTGCAGGATGACGGCCCTGGGTT
GTAAACTGCTTTTGCCGGGGAATAAAGTGCGGCACGTGTGCCGTTTTGCACGA
CCCGGAGAATAAGGACCGGCTATTCAAGCGCGCCCGGATAAT

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 127/132 (96 %)

Sekvence č. 39

AGGGGGGCGAAACCTGACCAGCACGCCGCGTGAAGGAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAACTTCTTTTATGAGGGACGAAGGACGTGACGGTACCTCATGAATAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCACAGCCGCGGTAACCAGCAGCCGCGGTAAT

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 131/136 (96 %)

Sekvence č. 40

GGAAACTGACCAGCACGCCGCGTGAAGAGAAGGCTTCGGGTTGTAAACTCTTT
ATGAGGGACGAAGGACGTGACGGTACCTCATGAATGCCCGCACCGTAACGAA
TANGCCTCGGCTAACTCTAATGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 83/87 (95 %)

5.1.4 Bakteriální druhy u jelenů z oborního chovu ze vzorků ze stolice

Poslední DGGE profil celkové bakteriální populace viz obr. 13 vyjadřuje bakteriální druhy identifikované u populace jelenů v oborním chovu ze vzorků ze stolice. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 9, získané porovnáním sekvencí vyřezaných fragmentů z gelu se sekvencemi v databázi GenBank.

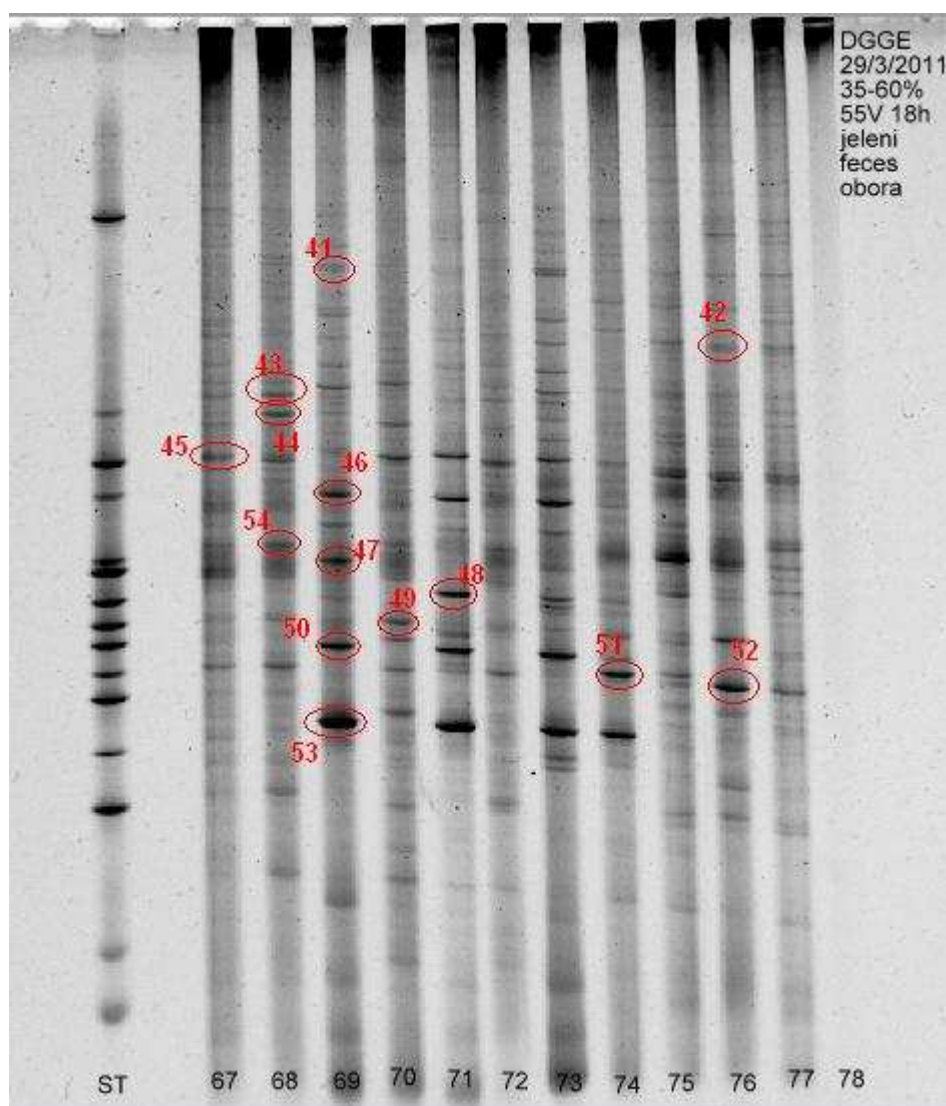
Z výsledků vyplývá, že nekultivovaná bakterie (fragment 41, 43, 44, 46, 48, 49, 51, 52) a nekultivovaná bachorová bakterie (fragment 45) byly identifikovány u všech jelenů.

Z těchto vzorků ze stolice byla izolována také *Bacillus* sp. (fragments 47, 50 a 53). Tyto fragmenty jsou na profilu DGGE velice výrazné. Jsou lokalizovány u jelenů 69, 71, 73, 74 a 75.

Další identifikovanou bakterií je *Eubacterium* sp. (fragment 42). Tyto bakterie byly lokalizovány u jelenů 67, 69, 70, 71, 73, 75, 76 a 77.

Poslední identifikovanou bakterií je nekultivovaná bakterie čeledi *Ruminococcaceae* (fragment 54), která byla lokalizována u jelenů 67, 68, 70, 75, 76, 77.

Obr. 13: DGGE profil celkové bakteriální populace u jelenů 67 – 78 (exkrementy)



Tab. č. 9: Výsledky zjištěné porovnáním získaných sekvencí se sekvencemi z databáze GenBank

Fragment	Nejbližší nalezená sekvence v GenBank	Podobnost
41	Nekultivovaná bakterie	99 %
42	<i>Eubacterium</i> sp.	93 %
43	Nekultivovaná bakterie	95 %
44	Nekultivovaná bakterie	94 %
45	Nekultivovaná bachorová bakterie	95 %
46	Nekultivovaná bakterie	96 %

47	<i>Bacillus</i> sp.	96 %
48	Nekultivovaná bakterie	95 %
49	Nekultivovaná bakterie	93 %
50	<i>Bacillus</i> sp.	98 %
51	Nekultivovaná bakterie	98 %
52	Nekultivovaná bakterie	99 %
53	<i>Bacillus</i> sp.	98 %
54	Nekultivovaná bakterie čeledi <i>Ruminococcaceae</i>	95 %

5.1.4.1 Získané sekvence

Sekvence č. 41

AACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCA
CTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATAACGTTAGTGTCTTGACGTTACC
GACAGAATAAGCACCGGCTAACTACTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 154/154 (100 %)

Sekvence č. 42

ACCCTGACCAGCGACGCCGCGTGAGTGAGAGGTTTTTCGGTATGTAAGCTCTAT
TGCAGGGAAGAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCC
GCCAGCCGCGGTAATAATACAG

***Eubacterium* sp.**

Identita = 120/129 (93 %)

Sekvence č. 43

GGGGCAACCCTGAACCAGCAACGCCGCCGTGAAGGAGAAGGNTTTTTTCGGATT
GTAAACTTCTTTTATTAGGGACGAAATTGACGGTACCTAATGAAAAGCTCCGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGAAAAAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 126/133 (95 %)

Sekvence č. 44

GGGGGAAACCTGACCAGCACGCCGCGTGAGGAGAAGGTTTTTCGGATTGTAA
ACTTCTTTTCTTAGGGAGGAAATTTGACGTTACCTAAGGAATAAGCTCCGGCTA
ACTACGTGCCGCCAGCCGCGGTAATAACATC

Nekultivovaná bakterie

Identita = 126/134 (94 %)

Sekvence č. 45

GGAAACCTGACCCAGCAACGCCGCGTGAGGAGAGGTTTTTCGGATTGTAAACCT
CTGTTTTTAGCGAAGAAAAAGGCGGTACCTGTNGCAGATTGCCCGTCCCCTAT
CTATGCGCCTCCCCCGCTANAAGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

Nekultivovaná bachorová bakterie

Identita = 74/78 (95 %)

Sekvence č. 46

AAAGCCTGAATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAGAGGTTCTTCGGATTGTAAAG
CACTTTAGTTAGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTA
CCGACAGAGTAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

Nekultivovaná bakterie

Identita = 151/157 (96 %)

Sekvence č. 47

GGGAAACCTTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAGAAGGCTTTCGGGTCGTA
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAAAGTACGAGAGTACTGCTCGTACCTTGACGG
TACCTAACAGAAAGCCACGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA

***Bacillus* sp.**

Identita = 143/148 (98 %)

Sekvence č. 48

GGGGGGAAAANNCTTGACGGCAGCATGCCGCGTGAGTGAGAGGTTTTTCGGAT
CGTAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAGTACGACAGTAACTGGTCGTACCTTG
ACGGTACCTAACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 141/148 (95 %)

Sekvence č. 49

GGGGGGNGGNNANCCTGAACCAGCAACGCCGCGTGAAGGAGAGGTCTTCGGA
TTGTAAACTTCTGTCTTCAGGGACGAAAAAGACGGTACCTGAGGAGGAAGCTC
CGGCTAACTACGTGCCGCCAGCCGCGGTAATATAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 121/130 (93 %)

Sekvence č. 50

CTGAANGCAGCAAGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTTCT
GTTGTGAGGGAAGAACAGTACGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTC
ATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAA

***Bacillus* sp.**

Identita = 141/144 (98 %)

Sekvence č. 51

ACCCTGACCAGCACGCCGCGTGAGGATGAAGGTTTTTCGGATTGTAACT
TCTTTTATCAGGGACGAAGCTTGACGGTACCTGATGAATAAGCTCCGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTACA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 125/128 (98 %)

Sekvence č. 52

AGGGGGGGGAAACTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAGAAGTATTTTCGGT
ATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCC
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAAA

Nekultivovaná bakterie

Identita = 132/134 (99 %)

Sekvence č. 53

ANGGGGGGAAAACCTGACGGAGCACGCCGCGTGACGATGAAGGCTTTCGGGT
CGTAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATA

***Bacillus* sp.**

Identita = 147/150 (98 %)

Sekvence č. 54

AACCTGNACCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAAGGTCTTCGGATTGTAAACCTCT
GTTGTCAGGGACGAAATGACGGTACCTGACGAGAGCCACGGCTACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTGANAATCCGCACCCGCGGTAATAAAT

Nekultivovaná bakterie čeledi *Ruminococcaceae*

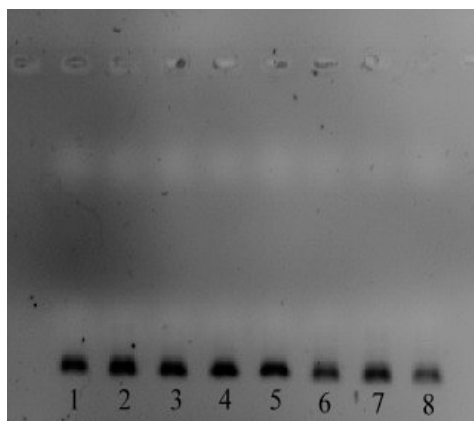
Identita = 109/115 (95 %)

5.1.5 Kontrola čistoty vyřezaných fragmentů

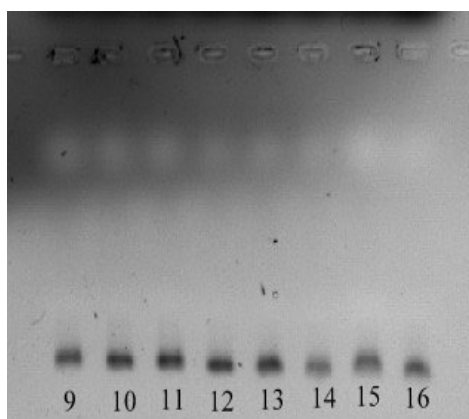
Agarózová elektroforéza byla použita pro ověření čistoty, formy a koncentrace izolované DNA před sekvenační reakcí u všech fragmentů vyřezaných z DGGE.

Z obr. 14 – 19 vyplývá, že všechny fragmenty vyřezané z gelu obsahují čistou a koncentrovanou DNA.

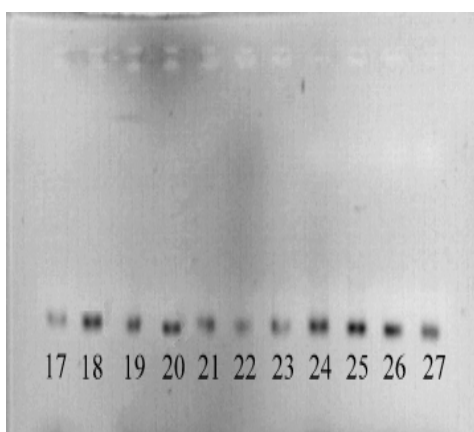
Obr. 14: Agarózová elektroforéza fragmentů č. 1 – 8



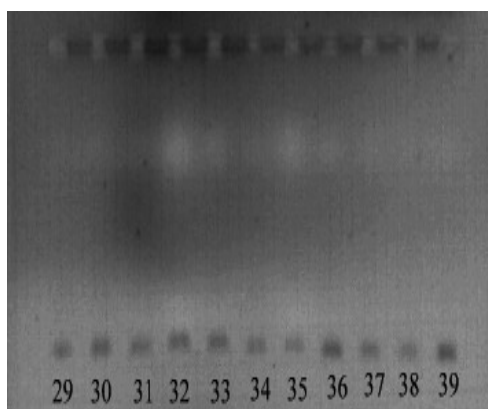
Obr. 15: Agarózová elektroforéza fragmentů č. 9 – 16



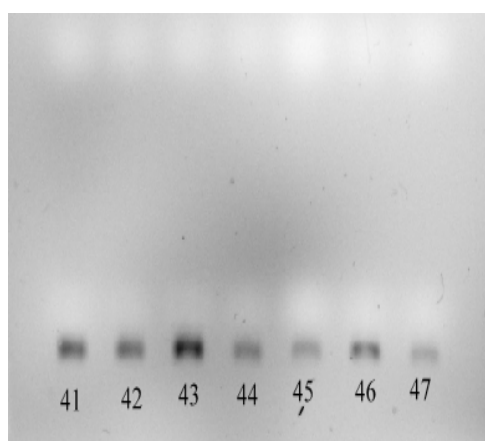
Obr. 16: Agarózová elektroforéza fragmentů č. 17 – 27



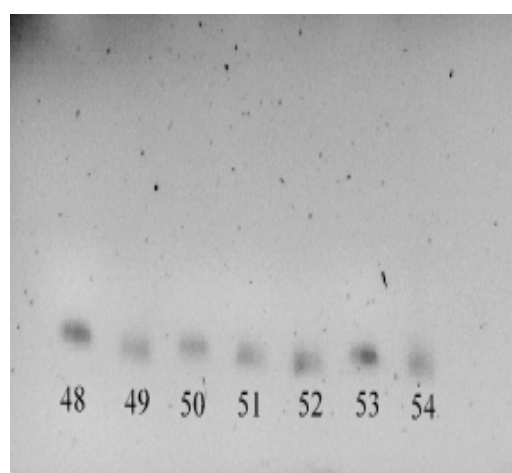
Obr. 17: Agarózová elektroforéza fragmentů č. 29 - 39



Obr. 18: Agarózová elektroforéza fragmentů č. 41 - 47



Obr. 19: Agarózová elektroforéza fragmentů č. 48 - 54



Vysoký stupeň variace mezi zvířaty byl pozorován v DGGE profilech zvířat z jednotlivých skupin, ačkoliv některé dominantní bandy ve stejných pozicích se podobaly u více jelenů.

Sekvenční analýza ukázala výraznou odlišnost mezi jednotlivými jeleny. Podobné výsledky byly popsány u sobů (SUNDSET A KOL. 2009). Zásadně odlišné DGGE profily byly nalezeny ve vzorcích exkrementů. Také v tomto případě lze konstatovat velkou odlišnost mezi jednotlivými jeleny. Profil DGGE vzorků exkrementů byl odlišný od profilů vzorků bachorových obsahů.

Většina studií složení mikroflóry bachoru byla provedena na hospodářských zvířatech: skotu, ovcích, kozách a buvolích. U volně žijících přežvýkavců bylo publikováno několik prací s touto tematikou provedených především v severských zemích na sobech (SUNDSET A KOL. 2009; SUNDSET A KOL. 2010).

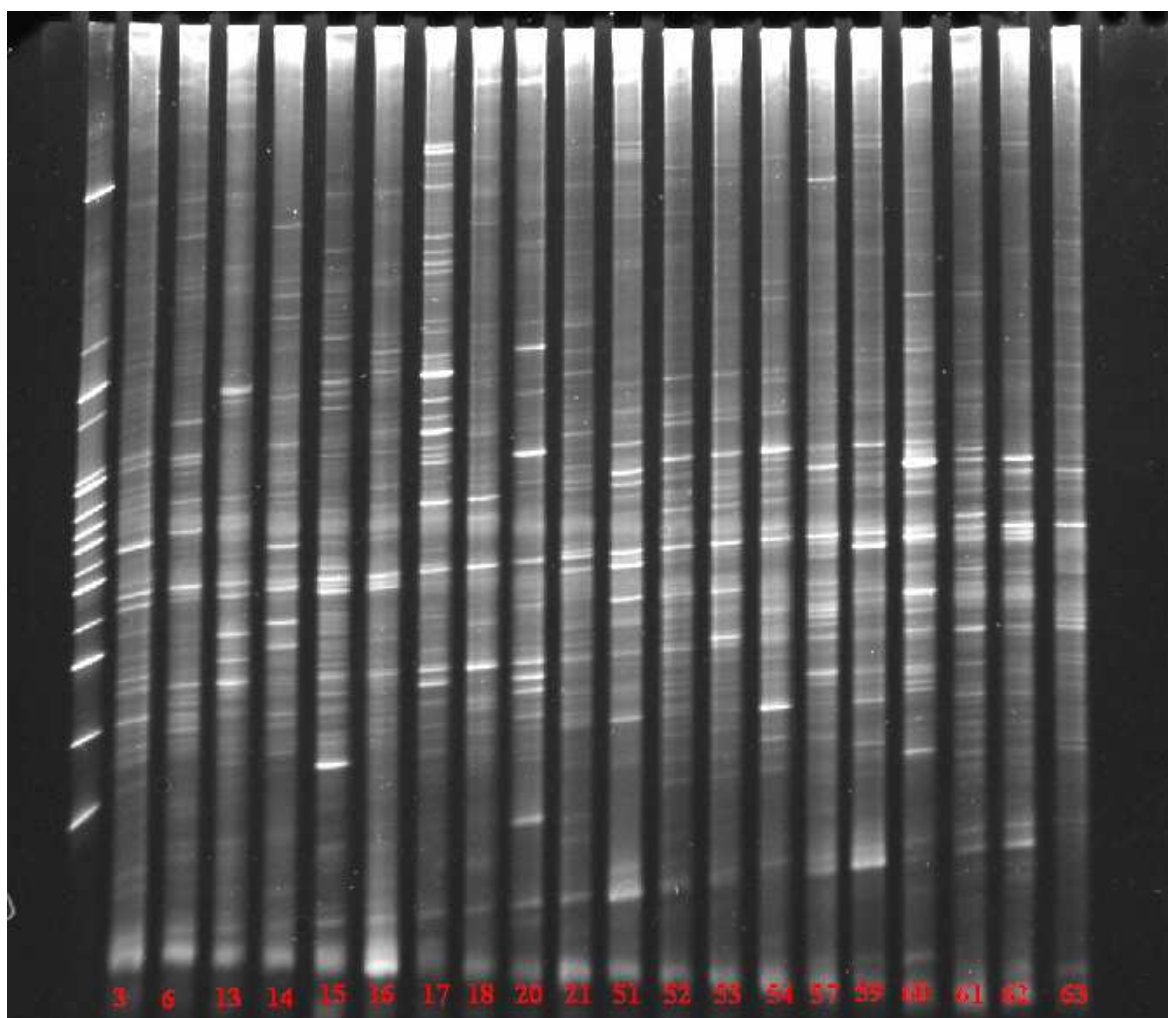
Většina identifikovaných bakteriálních 16S rRNA genových sekvencí izolovaných ze vzorků bachorových obsahů sobů byly prezentovány jako dosud nekultivované druhy.

5.2 Konstrukce fylogenetického stromu

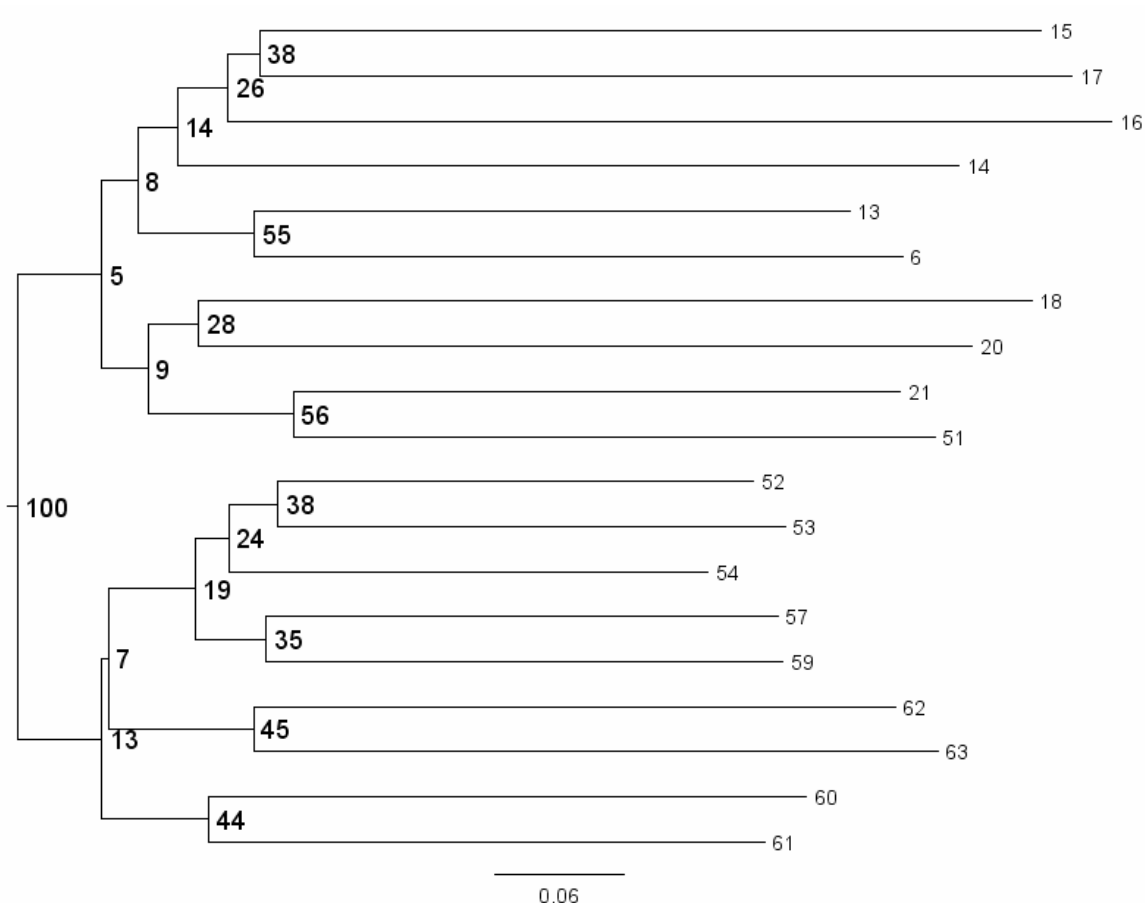
Pro porovnání fylogenetické podobnosti mikroorganismů osidlující trávicí trakt jelenů ve vzorcích odebraných z bachoru chovaných ve volnosti a v oboře byl vytvořen fylogenetický strom. Pro tento pokus bylo vybráno z každé lokality 10 vzorků. Z chovu ve volnosti byly vybrány vzorky č. 3, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 a z chovu oborního č. 51, 52, 53, 54, 57, 59, 60, 61, 62 a 63. Obr. 20 znázorňuje DGGE profil jednotlivých vzorků a jasně viditelné bandy DNA jednotlivých mikroorganismů osidlující trávicí trakt jelenů.

Výsledky vyjadřuje fylogenetický strom na obr. 21. Z obrázku vyplývá, že fylogenetická podobnost obou porovnávaných lokalit je odlišná. Jsou zde jasně vidět odlišnosti obou větví fylogenetického stromu. Horní vyjadřuje mikroorganismy zastoupené v trávicím traktu ve volném chovu. Dolní větev vyjadřuje mikroorganismy zastoupené v trávicím traktu v oboře. Jediná odlišnost je u vzorku č. 51, který je zastoupen v horní větvi.

Obr. 20: DGGE profil použitý pro konstrukci fylogenetického stromu ze vzorků z batoru



Obr. 21: Fylogenetický strom



5.3 Počty jednotlivých mikroorganismů osidlující trávicí trakt

Kvantitativní klasifikace mikroorganismů kolonizujících trávicí trakt jelena evropského byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce RealTime qPCR. Pro tuto metodu byly zvoleny primery, které amplifikují V3 oblast 16 S rDNA. Pomocí této metody byly využitím detekce úseků rDNA charakteristických pro typové mikroorganismy klasifikovány skupiny: celkové bakterie (*Eubacterium*), *Bacteroides*, *Clostridium*., *Desulfovibrio*, *Aspergillus*, *Escherichia* a *Bifidobacterium*.

Kvantifikace byla prováděna u jelenů ze dvou lokalit a to z volného a oborního chovu. U každé lokality bylo vybráno 12 vzorků. 6 vzorků bylo odebráno z bachorového obsahu a 6 vzorků bylo odebráno z exkrementů. V každé této šestici vzorků byli zastoupeni 2 jeleni, 2 laně a 2 kolouši. Výsledky každé skupiny jsou zprůměrovány a vyjádřeny v následujících grafech.

5.3.1 Celkové bakterie

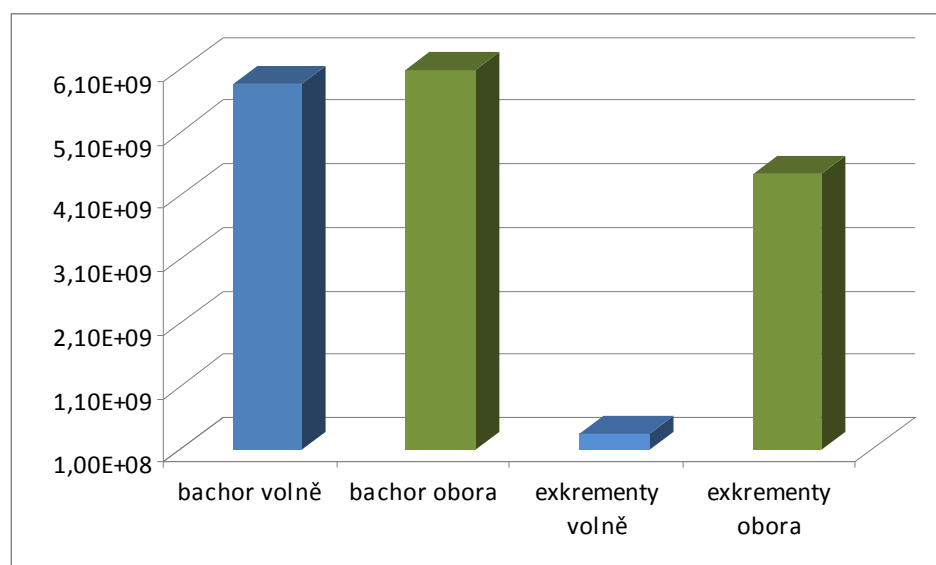
V klasifikaci je zachyceno množství celkových bakterií v bacheru a exkrementech v porovnání mezi dvěma lokalitami volnosti a obora. Výsledky jsou uvedeny v grafu č. 3.

Z grafu vyplývá, že počet celkových bakterií v bacheru ve volném chovu nabývá hodnoty $5,85E+09$ a v chovu oborním $6,07E+09$. V tomto případě můžeme hovořit o minimální rozdílu mezi touto skupinou vzorků.

V případě exkrementů porovnávanými mezi oběma lokalitami dojdeme k závěru, že množství celkových bakterií v exkrementech ve volném chovu nabývá hodnoty $3,59E+08$, v oborním chovu množství nabývá hodnoty $4,44E+09$. Rozdíl mezi těmito lokalitami je značný.

Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v počtech celkových bakterií jsou nevýznamné.

Graf č. 3: Počet celkových bakterií v bacheru a exkrementech ve volnosti a v oboře



5.3.2 Bacteroides

V tomto případě byla prováděna kvantifikace skupiny bakterií *Bacteroides* ve vzorcích odebraných z bacheru a z exkrementů v porovnání mezi chovem ve volnosti a chovem oborním.

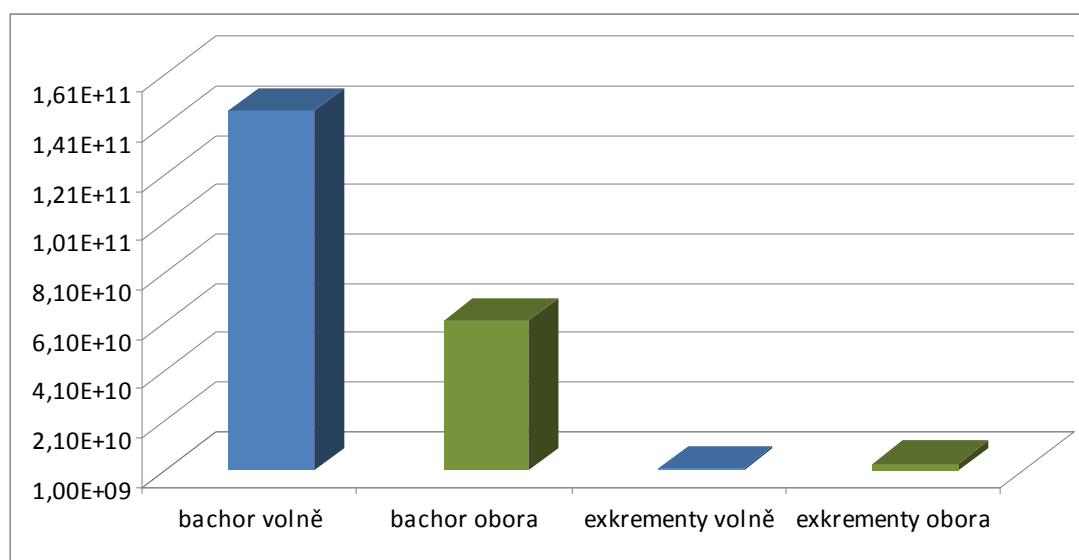
Tento rod *Bacteroides* zahrnuje anaerobní bakterie a jsou běžně součástí bakterií kolonizující trávicí trakt zvířat i lidí. Některé tyto druhy bakterií fermentují cukry a produkují kyselinu jantarovou, mléčnou, propionovou, mravenčí a octovou.

Z výsledků vyjádřených v grafu č. 4 vyplývá, že je značný rozdíl mezi počty bakterií v bacheru mezi lokalitami. Ve volnosti bylo kvantifikováno $1,47E+11$ a v oborním chovu $6,22E+10$. Tento rozdíl může být způsoben vlivem odlišného příjmu potravy, zejména vysokého příjmu jadrných krmiv v oborním chovu.

V případě exkrementů výsledky dosahovaly hodnot ve volném chovu $2,00E+09$ a v oborních chovu $4,03E+09$.

Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v počtech bakterií skupiny *Bacteroides* jsou statisticky nevýznamné.

Graf č. 4: Počet bakterií skupiny *Bacteroides* v bacheru a exkrementech ve volnosti a v oboře



5.3.3 Clostridium

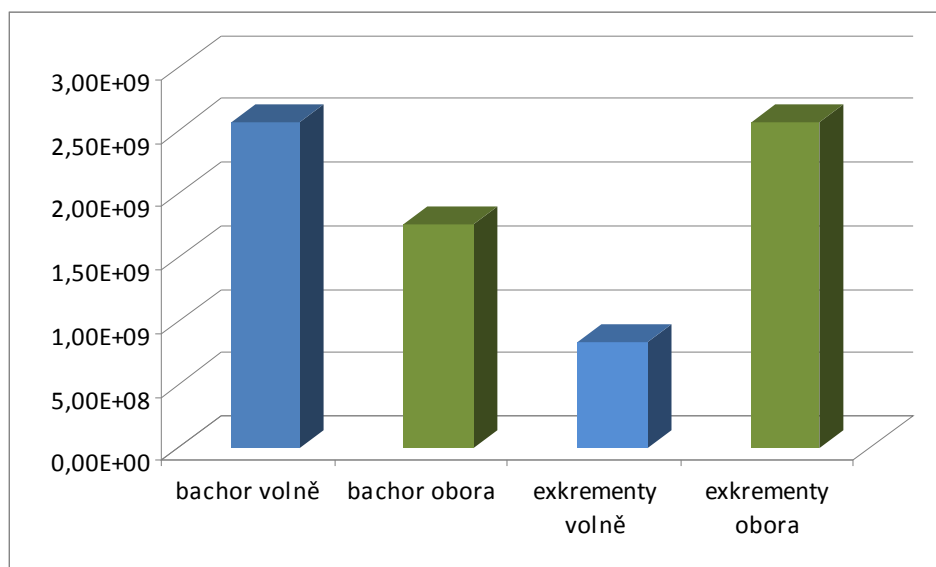
Kvantifikace skupiny bakterií *Clostridium* byla prováděna ve vzorcích odebraných z bacheru a z exkrementů v porovnání mezi chovem ve volnosti a chovem oborním.

Jedná se o anaerobní bakterie, které kolonizují trávicí trakt. Fermentují z kvasitelné zdroje uhlíku za vzniku ethanolu, butanolu, kyseliny octové, máselné a hexanové (BYOUNG A KOL. 2010).

Graf č. 5 vyjadřuje výsledné množství bakterií. U vzorků odebraných z bacheru je velký rozdíl mezi lokalitami. Ve volném chovu je množství bakterií $2,57E+09$ a v oboře $1,75E+09$. U vzorků odebraných z exkrementů dosahují hodnoty ve volném chovu $8,31E+08$ a v oboře $2,57E+09$.

Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v počtech bakterií *Clostridium* jsou statisticky nevýznamné.

Graf č. 5: Počet bakterií skupiny *Clostridium* v bachoru a exkrementech ve volnosti a v oboře



5.3.4 *Desulfovibrio*

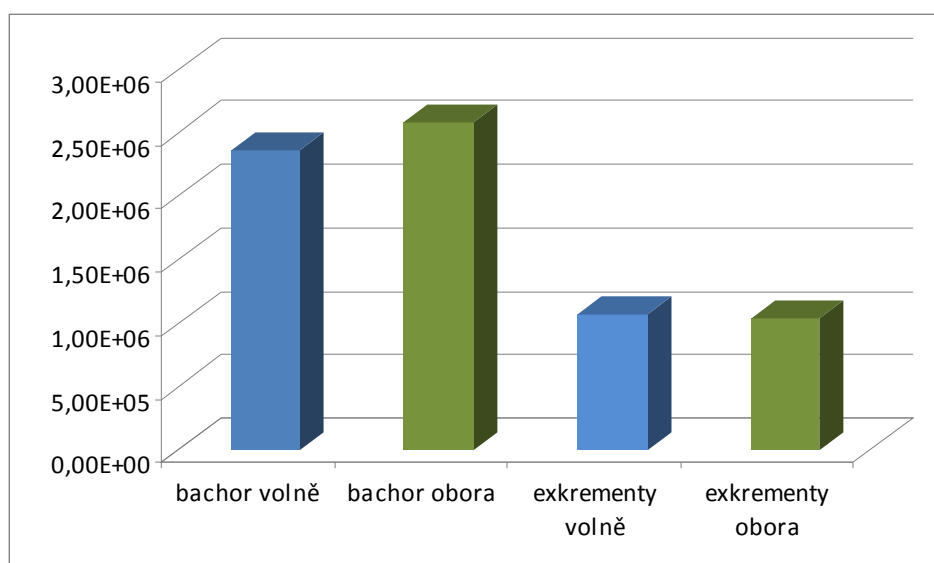
V kvantifikaci je zachyceno množství bakterií skupiny *Desulfovibrio* v bachoru a exkrementech v porovnání mezi dvěma lokalitami volnost a obora. Výsledky jsou uvedeny v grafu č. 6.

Skupina bakterií *Desulfovibrio* patří do anaerobních bakterií, které byly izolovány z mořského prostředí, trávicího ústrojí člověka i zvířat (WARREN A KOL. 2005).

Z výsledků vyplývá, že velké rozdíly mezi hodnotami naměřenými v bachoru i exkrementech nabývají v obou lokalitách podobných hodnot. Počet bakterií v bachoru ve volnosti nabývá hodnoty 2,35E+06 a v oboře 2,57E+06. U exkrementů ve volném chovu je počet bakterií 1,07E+06 a v oboře 1,04E+06.

Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v počtech bakterií skupiny *Desulfovibrio* jsou nevýznamné ve všech případech na hladinách $P < 0,05$.

Graf č. 6: Počet bakterií skupiny *Desulfovibrio* v bachoru a exkrementech ve volnosti a v oboře



5.3.5 *Aspergillus*

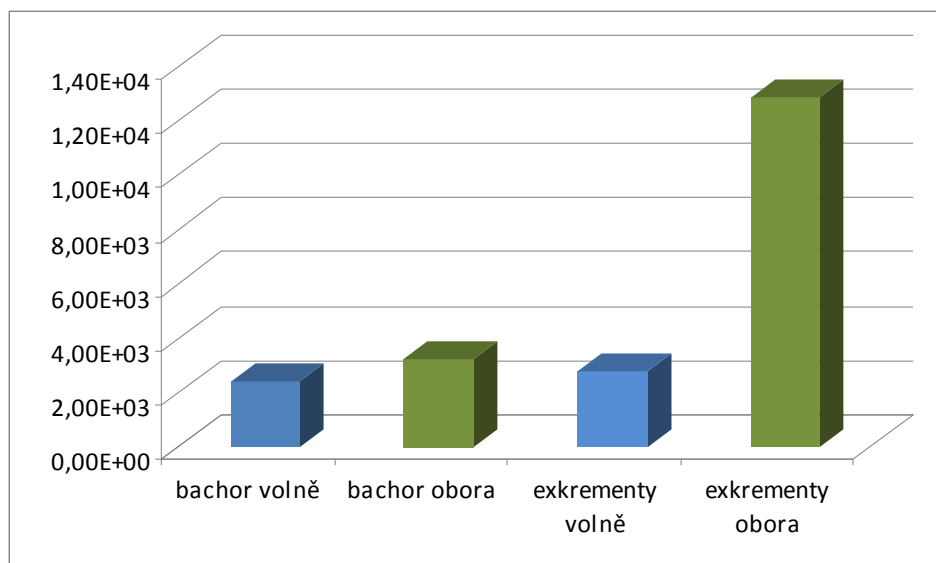
V tomto případě byla prováděna kvantifikace anaerobních hub skupiny *Aspergillus* ve vzorcích odebraných z bachoru a z exkrementů v porovnání mezi chovem ve volnosti a chovem oborním.

Skupina *Aspergillus* patří mezi vláknité houby, jsou to velice důležité mikroorganismy. Produkují extracelulární enzymy a kyselinu citrónovou. Mohou způsobovat onemocnění zvané černé plísňe na některých druzích ovoce a zeleniny. Tyto houby se nejčastěji vyskytují v půdě a byly identifikovány i v trávicím traktu zvířat (SCHUSTER A KOL. 2002).

Graf č. 7 vyjadřuje výsledky měření počtů těchto hub. Ve vzorcích z bachoru bylo naměřeno ve volném chovu $2,38E+03$ a v oboře $3,24E+04$. Tyto hodnoty nevyjadřují téměř žádný rozdíl. Naproti tomu u vzorků z exkrementů je rozdíl značný. Ve volném chovu dosahují naměřené hodnoty počtu $2,79E+03$ a v oboře $1,28E+04$. Tento rozdíl může být způsoben vlivem nekvalitního objemového krmiva předkládaném v oborním chovu.

Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v počtech anaerobních hub skupiny *Aspergillus* jsou nevýznamné ve většině případech na hladinách, kromě rozdílů mezi lokalitou exkrementy volně a exkrementy obora, které jsou statisticky významné na hladině $P < 0,05$.

Graf č. 7: Počet anaerobních hub skupiny *Aspergillus* v bachoru a exkrementech ve volnosti a v oboře



5.3.6 *Escherichia*

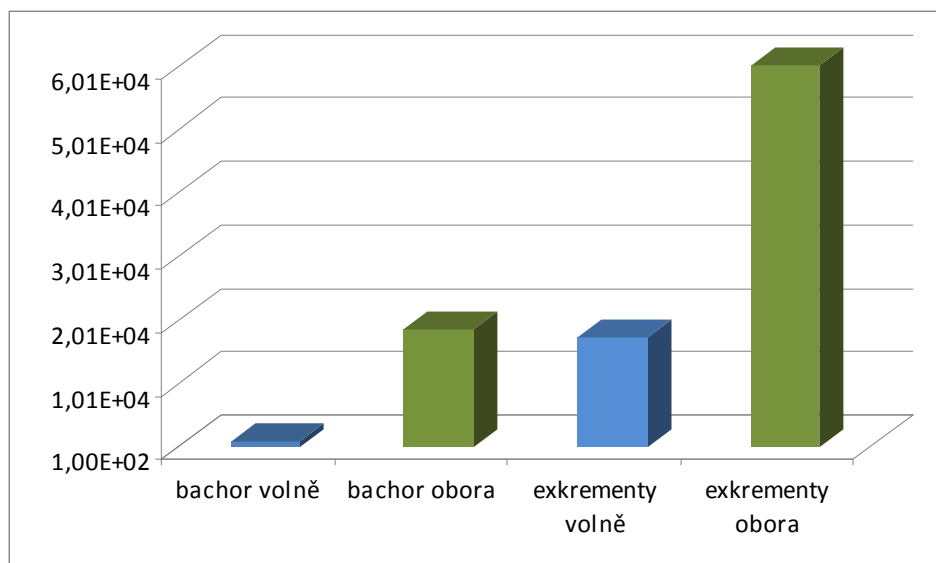
V pokusu je zachyceno množství bakterie náležící k enterobakteriím v bachoru a exkrementech v porovnání mezi dvěma lokalitami volnost a obora. Výsledky jsou uvedeny v grafu č. 8.

Tato bakterie je fakultativně anaerobní bakterie žijící v trávicím traktu teplokrevných živočichů. Je to jeden z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry a její přítomnost je nezbytná pro správný průběh trávicích procesů (GIAMMANCO A KOL. 1996).

Jednotlivé počty vyjadřuje graf č. 8. Z grafu vyplývá, že v oborním chovu byly naměřeny větší počty bakterií než ve volném chovu. V bachoru bylo naměřeno ve volném chovu $8,61E+02$ a v oborním $1,85E+04$. V případě exkrementů dosahují ve volném chovu hodnot $1,73E+04$ a v oborním chovu $6,00E+04$.

Rozdíly v počtech Enterobakterií jsou statisticky významné mezi lokalitami bachor volně a bachor obora na hladině $P < 0,05$.

Graf č. 8: Počet bakterií skupiny *Escherichia* v bachoru a exkrementech ve volnosti a v oboře



5.3.7 *Bifidobacterium*

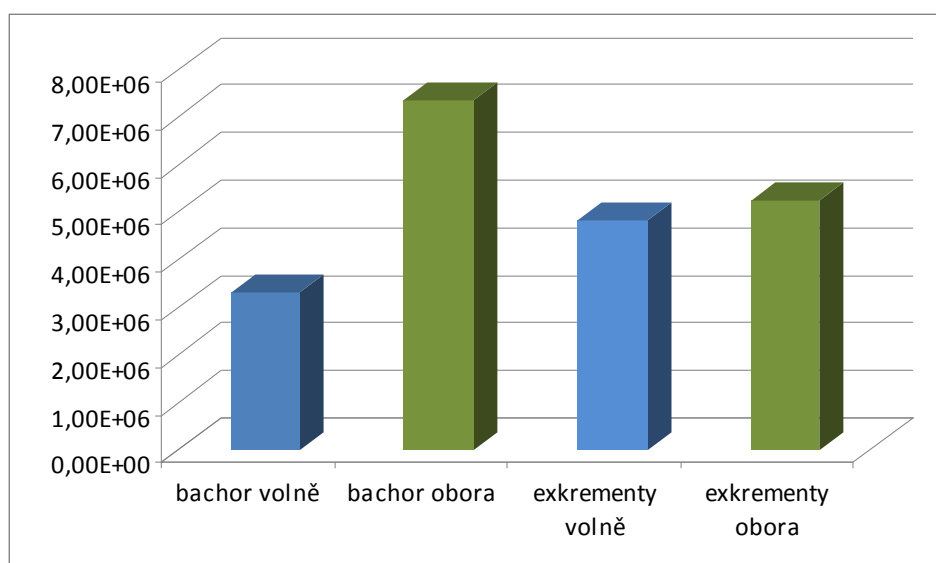
V případě bakterií skupiny *Bifidobacterium* byla prováděna kvantifikace ve vzorcích odebraných z bachoru a z exkrementů v porovnání mezi chovem ve volnosti a chovem oborním.

Jedná se anaerobní bakterii osidlující trávicí trakt lidí i zvířat. V trávicím traktu fermentuje cukry a produkuje kyselinu mléčnou a kyselinu octovou (GUARNER A KOL. 2003).

Z výsledků, které vyjadřuje graf č. 9 vyplývá, že ve vzorcích v bachoru dosahují počty bakterií ve volném chovu $3,31E+06$ a v oborním chovu $7,35E+06$. U vzorků z exkrementů dosahují počty bakterií hodnot ve volném chovu $4,84E+06$ a v oboře $5,22E+06$.

Rozdíly mezi jednotlivými lokalitami v počtech bakterií skupiny *Bifidobacterium* jsou statisticky nevýznamné.

Graf č. 9: Počet bakterií skupiny *Bifidobacterium* v bachoru a exkrementech ve volnosti a v oboře



V dostupné literatuře jsme nenalezli informace obdobných studií provedených na jelenu evropském. Nelze tedy diskutovat naše výsledky získané v oborním chovu a volnosti u této zvěře.

6. ZÁVĚR

V předložené práci jsme pomocí molekulárně genetických metod (denaturační gradientová gelová elektrofozéra DGGE, polymerázová řetězová reakce PCR) sledovali složení mikrobiální populace bachoru a exkrementů jelena evropského chovaného ve volnosti a v oborním chovu. Typické skupiny mikroorganismů jsme kvantifikovali pomocí metody PCR RealTime. Příbuznost detekovaných mikroorganismů byla ověřena pomocí metody fylogenetických stromů.

Vysoký stupeň variace byl pozorován v DGGE profilech zvířat u jednotlivých skupin, ačkoliv některé dominantní bandy ve stejných pozicích se podobaly u více zvířat. DGGE profily ukázaly vysoký stupeň diverzity mikrobiální populace každého subjektu. Jejich porovnáním jsme neprokázali významné odlišnosti mezi ověřovanými skupinami. Zásadně odlišné DGGE profily byly nalezeny ve vzorcích exkrementů. Také v tomto případě lze konstatovat velkou odlišnost mezi jednotlivými zvířaty. Profil DGGE vzorků exkrementů byl odlišný od profilů vzorků bachorových obsahů. Sekvenační analýza 54 identifikovaných fragmentů odhalila, že většina sekvencí náleží k nekultivovaným a nekultivovaným bachorovým bakteriím. Dále byly detekovány sekvence odpovídající rodům *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Pseudomonas* a *Eubacterium*. Fylogenetickou odlišnost mezi mikroflórou bachoru u obou skupin zvířat jsme ověřovali metodou fylogenetických stromů. S výjimkou jednoho izolátu byly obě populace detekovaných mikroorganismů charakterizovány jako odlišné.

Výsledky metody PCR RealTime ukázaly v bachorovém obsahu jelenů z volně žijící populace vyšší počty Clostridií a *Bacteroides*. V případě celkových bakterií, *Desulfovibrií*, *Enterobakterií* a *Bifidobakterií* nebyly nalezeny významné rozdíly. Ve vzorcích exkrementů z oborního chovu byly detekovány vyšší počty celkových bakterií, Clostridií a významně vyšší počty u *Aspergillus* a *Enterobakterií*.

S ohledem na dosažené výsledky lze konstatovat, že vytyčené cíle byly splněny. Použitými metodami jsme prokázali, že mikrobiální populace bachoru a tlustého střeva u jelena evropského chovaného v oboře a drženého ve volnosti je odlišná. Předpokládáme, že hlavní příčinou těchto rozdílů je odlišná skladba dostupné potravy a v oborním chovu s intenzivnějším příkrmováním skladba a kvalita předkládaných krmiv.

Jsme si vědomi, že počty bakterií stanovené metodou RT PCR jsou vymezeny volbou primerů a jejich specifitou. S ohledem na cíl práce jsme z dostupných primerů zvolili ty,

jejich požitím jsme očekávali získat úplnější obraz o složení širší populace mikroorganismů. Jsme si vědomi metodického omezení, pro komplexnější přístup k dané problematice by bylo vhodné použít více specifitějších primerů, rozšířit studii o prvoky a anaerobní houby. Takto pojatá studie by však přesáhla reálné možnosti diplomové práce.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALLEN A. Structure and function of gastrointestinal mucus. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson L.R., ed., New York: Raven Press, 1981, s. 617-619.

BAILEY R. W., MACRAE J. C. The hydrolysis by rumen and cecal microbial enzymes of hemicellulose in plant and digesta particles. *Journal of Agricultural Sciences*, 1970, vol. 75, s. 321.

BARTOSCH S., FITE A., MACFARLANE G. T., MCMURDO M. E. T. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using Real-Time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, vol. 70, no. 6, s. 3575-3581.

BARTOŠ S. *Mikrobiologie a biochemie trávení v bacheru přežvýkavců*. Praha: Academia, 1987, 187 s.

BRAUN U., RIHS T., SCHEFER U. Ruminal acidosis in sheep and goats. *The Veterinary Record*, 1992, vol. 130, s. 343-349.

BYOUNG S.-J., BYUNG-CHUN K., YOUNGSOON U., BYOUNG-I. N. S. Production of hexanoic acid from D-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2010, vol. 88, s. 1161-1167.

COLEMAN G. S. Rumen ciliate protozoa. *Advances in Parasitology*, 1980, vol. 18, s. 121-173.

COLMAN J. E., MYSTERUD A., JORGENSEN N. H., MOE S. R. Active land use improves reindeer pastures: evidence from a patch choice experiment. *Journal of Zoology*, 2009, vol. 279, s. 358-363.

DURANTE P., CORTAY G., DENUC J., DESCHRYVER C., ROSSIGNOL C. *Myslivost*. Havlíčkův Brod: Fragment, 2004, 285 s., ISBN 80-7200894-3.

FINLAY B., FENCHEL T. An anaerobic ciliate as a natural chemostat for the growth of endosymbiotic methanogens. *European Journal of Protistology*, 1992, vol. 28, s. 127-137.

FLINT H. J. The rumen microbial ecosystem – some recent developments. *Trends in Microbiology*, 1997, vol. 5, s. 483-488.

FONTY G., JOUANY J. P., SENAUD J., GOUET P. H., BRAUN J. The evolution of microflora and digestion in the rumen of lamb from birth to 4 months. *Canadian Journal of Animal Sciences*, 1984, vol. 64, Suppl., s. 165-166.

FOREJTEK P., DOVRTĚL J., STACH R., VRBA P., ZUMRIK M. *Správné ošetření a zdravotní posouzení ulovené zvěře*, Zlín: Graso, 2009, 167 s., ISBN 978-80-7305-055-9

FORSBERG C. W., CHENG K. - J., WHITE B. A. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 1, Mackie R. I. and White B. A., eds., New York: Chapman and Hall, 1997, s. 319-380.

GIAMMANCO A., MAGGIO M., GIAMMANCO G., MORELLI R., MINELLI F., SCHEUTZ F., CAPRIOLI A. Characteristics of Escherichia coli strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhoea. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, vol. 343, s. 689-694.

GUARNER F., MALAGELADA J. R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 2003, vol. 361, no. 9356, s. 512-519.

HAMPL V., PAVLÍČEK A., FLEGR J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, vol. 51, s. 731-735.

HANZAL, V., HROMAS, J., KOVAŘÍK, J., POLÁKOVÁ, D., PONDĚLÍČEK, J., HANÁK, J., ZVOLÁNEK, P., MEDKOVÁ, M. *Velká myslivecká encyklopedie*. CD-ROM, České Budějovice: GRAND s.r.o., 2006.

HEID C. A., STEVENS J., LIVAK K. J., WILLIAMS P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 1996, vol. 6, no. 10, s. 986-994.

HESPELL R. B., AKIN D. E., DEHORITY B. A. 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, 1997, s. 319-380.

HINTNAUS J. Racionální přikrmování jelení zvěře. *Myslivost*, 2000, no. 12, s. 24-26.

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

HO Y. W., BARR D. J. S., ABUDULLAH N., JALALUDIN S., KUDO H. A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia. *Myco Taxon*, 1993, vol. 47, s. 285–293.

HUME D. I. Fermentation in the hindgut of mammals. In: *Gastrointestinal Microbiology*, vol. 1, Mackie R. I., White B. A., eds., New York: Chapman and Hall, 1997, s. 84-115.

HUME I. D., WARNER A. C. I. Evolution of microbial digestion in mammals. In: *Digestive physiology and metabolism in ruminants*. Ruckebusch Y., Thivend P., eds., Lancaster: MTP press Ltd., 1980, s. 617.

HUNGATE R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Review*, 1950, vol. 14, s. 1.

HUNGATE R. E. *The rumen and its microbes*. New York: Academic press, 1966, 533 s.

CHENG K.-J., IRWIN R. T., COSTERTON J. W. Autochthonous and pathogenic colonization of animal tissues by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1981, vol. 27, no. 5, s. 461-490.

CHURCH D.C. Digestive physiology and nutrition of ruminants, vol. 1., Oregon: O.S.U. Book Inc. Stres, 1967, 449 s.

IBRAHIM E. A., INGALLS J. R. Microbial protein biosynthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 1972, vol. 55, s. 971-978.

JELÍNEK R. Škody zvěří, část II.: Předcházení škod na zemědělských plodinách a lesních porostech, *Myslivosť*, 2007, no. 3, s. 5-8.

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

JOUANY J. P., DEMEYER D. I., BRAUN J. Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science Technology*, 1988, vol. 21, s. 229-265.

KAUFMANN P., PFEFFERKORN A., TEUBER M., MEILE L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 4, s. 1268-1273.

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

KITAHARA M., SAKAMOTO M., IKE M., SAKATA S., BENNO Y. *Bacteroides plebeius* sp nov. and *Bacteroides coprocola* sp nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, vol. 55, s. 2143-2147.

KLEIN R. D., KINCAID R. L., HODGSON A. S., HARRISON J. H., HILLERS J. K., CRONRATH J. D. Dietary fiber and early weaning on growth and rumen development of calves. *Journal of Dairy Science*, 1987, vol. 70, s. 2095-2104.

KRAUSE D. O., RUSSELL J. B. How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Sciences*, 1996, vol. 79, s. 1467-1475.

KUKAŇOVÁ J., PICKA J. Vitamino-minerální výživa spárkaté zvěře. *Myslivost*, 2008, no. 10, s. 36 – 37.

LENG J., ZHONG X., ZHU R. J., YANG S. L., GOU X., MAO H. M. Assessment of protozoa in Yunnan yellow cattle rumen based on the 18S r RNA sequences. *Molecular Biology Rep.*, 2011, vol. 38, s. 577-585.

LOCHMAN J., HANZAL V., LOŠŤÁK B., PAVLÍK P., RYS J., STUDNÍČKA E., ZUMR J. *Jelení zvěř*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1985, 352 s., DT 639.1.

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

MAIDAK B. L., LARSEN N., MCCAUGHEY M. J., OVERBEEK R., OLSEN G. J., FOGE K., BLANDY J., WOESE C.R. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, s. 3485-3487.

MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982, s. 350.

MCALLISTER T. A., BAE H. D., JONES G. A., CHENG K. J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Sciences*, 1994, vol. 72, s. 3004-3018.

MIHOLOVÁ B., LIPSKÝ D. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1976, 258 s., DT 619:611/612.

MILLER D. W. H., GAILLARD J. – M., LACKEY L. B., HATT J. – M., CLAUSS M. Comparing life expectancy of three deer species between captive and wild populations. *European Journal Wild Research*, 2010, vol. 56, s. 205-208.

MOUNTFORT D. O., ASHER R. A. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocalimastix frontalis*. *Applied Environmental Microbiology*, 1989, vol. 55, s. 1016-1022.

MUYZER G., DE WAAL E. C., UITTERLINDEN A. G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, vol. 59, s. 695-700.

MYERS R. M., FISCHER S. G., LERMAN L. S., MANIATIS T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clump can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 1985, vol. 13, no. 9, s. 3131-3145.

NAM E. T. A., CHANG Y. S., HONG H. B., LEE Y. E. A novel catabolic activity of *Pseudomonas veronii* in biotransformation of pentachlorophenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 62, s. 284–90.

ODA H., FUKUI H., HITOMI Y., YOSHIDA A. Alternation of serum lipoprotein metabolism by polychlorinated biphenyls and methionine in rats fed a soybean protein diet. *Journal of Nutrition*, 1991, vol. 121, s. 925-933.

ORPIN C. G., JOBLIN K. N. The rumen anaerobic fungi. In: *The rumen microbial ecosystem*, Hobson P.N., Stewart C.S., eds., London: Blackie Academic and Professional Publishers, 1997, s. 140-195.

PEARSON H. A. Rumen microbial ecology in mule deer. *Applied Microbiology*, 1969, vol. 17, s. 819-824.

PENNINGTON R. J. The metabolisms of short-chain fatty acids in the sheep. Fatty acid utilization and ketone body production by rumen epithelium and other tissues.

Biochemical Journal, 1952, vol. 51, s. 251-258.

REDDY B. S., ENGLE A., SIMI B., GOLDMAN M. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology*, 1992, vol. 102, s. 1475-1482.

RUSSELL J. B., HESPELL R. B. Microbial rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, 1981, vol. 64, s. 1153-1169.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 312 s.

SCHABEREITER-GURTNER C., SELITSCH B., ROTTER M. L., HIRSCHL A. M., WILLINGER B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, vol. 45, no. 3, s. 906-914.

SCHUSTER E., DUNN-COLEMAN N., FRISVAD J., VAN DIJCK P. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, vol. 59, no. 4-5, s. 426-435.

SNEDECOR, G. W., COCHRAN W. G. *Statistical methods*, 6th edn., Iowa State University Press, Ames, IA, 1967.

STARK S., MANNISTO M. K., SMOLANDER A. Multiple effects of reindeer grazing on the soil processes in nutrient-poor northern boreal forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, vol. 42, s. 2068-2077.

STEVENS C. E., HUME I. D. The mammalian gastrointestinal tract. In: *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*, 2nd. ed., Cambridge University Press, 1995, s. 46-93.

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

SUNDSET M. A., EDWARDS J. E., CHEBG Y. F., SENOSIAIN R. S., FRAILE M. N., NORTHWOOD K. S., PRAESTENG K. E., GLAD T., MATHIESEN S. D., WRIGHT A.-D. G. Molecular diversity of the rumen microbiome of norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecology*, 2009, vol. 57, s. 335-348.

SUNDSET M. A., BARBORA P. S., GREEN T. K., FOLKOW L. P., BLIX A. S., MATHIESEN S. D. Microbial degradation of usnic acid in the reindeer rumen. *Naturwissenschaften*, 2010, vol. 97, s. 273-278.

ŠTĚPÁNEK Z., KOVAŘÍK J., KOLLÁR F., KOSTEČKA J., KREJČÍ L., POLÁKOVÁ D., VOSÁTKA P. *Penzum – Základy znalostí z myslivosti*, Praha: Druckvo, 2003, 118 s., ISBN 80-239-0047-1.

THEODOROU M. K., LOWE S. E., TRINCI A. P. J. The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. *Biosystems*, 1988, vol. 21, no. 3-4, s. 371-376.

THEODOROU M. K., MENNIM G., DAVIES D. R., ZHU W.-Y., RICKERS A., NIELSEN B. B., GULL K., TRINCI A. P. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1996, vol. 55, no. 3, s. 913-926.

VACH M., BARNET V., BEJČEK V., HANZAL V., HROMAS J., RŮŽIČKA J., SVÁROVSKÝ J., ŠTĚPÁNEK Z., WOLF R., SEHNAL J., ADÁSEK I., ŘEHÁK L. *Myslivost*. Uhlířské Janovice: Silvestris, 1999, 272 s., ISBN 80-901775-2-2.

VAŘEJKA F., MRÁZ O., SMOLA J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. Praha: SZN, 1989, 330 s.

VESELÝ Z., CHLOUPKOVÁ V., JAGOŠ P., JAKOBE P., JAMBOR V., KOLÁŘ I., LAKOTA V., OCHODNICKÝ D., PISKAČ A., ŠIMEČEK K., ŠPAČEK F. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*, Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1984, 360 s., DT 636-084.

VODŇANSKÝ, M. Význam klidu u jelení zvěře pro lepší využívání přirozených potravních zdrojů a snížení nebezpečí vzniku škod. *Myslivost*, 2008, no. 2, s. 11-13.

WALLACE R. J., BRODERICK G. A., BRAMMALL, M. L. Protein degradation by ruminal microorganisms from sheep fed dietary supplements of urea, casein or albumin. *Applied Environmental Microbiology*, 1987, vol. 53, s. 751-753.

WANAPAT M., PILAJUN R., KONGMUN P. Ruminal ecology of swamp buffalo as influenced by dietary sources. *Animal Feed Science Technology*, 2009, vol. 151, s. 205-214.

WARREN Y. A., CITRON D. M., MERRIAM C. V., GOLDSTEIN J. E. Biochemical Differentiation and Comparison of *Desulfovibrio* Species and Other Phenotypically Similar Genera. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, vol. 43, no. 8, s. 4041–4045.

WILLIAMS A. G., COLEMAN G. S. Hemicelulose degrading enzymes in rumen ciliate protozoa. *Current Microbiology*, 1985, vol. 12, s. 85-90.

WINKELMAYER R., LEBERSORGER P., ZEDKA H., FOREJTEK P., VODŇANSKÝ M., VEČEREK V., MALENA M., NAGY J., LAZAR P. *Hygiena zvěřiny*, Jihlava: Ekon, 2005, 168 s., ISBN 80-7305- 523-6.

ZABLOUDIL F., VALA Z. Význam vody pro zvěř. *Myslivost*, 2009, no. 11, s. 40 – 43.

