

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Charakterizace laktobacilů a bifidobakterií
izolovaných z trávicího traktu divokých a domácích prasat**

Bakalářská práce

Autor práce: Julius Šimurka

Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Charakterizace laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu divokých a domácích prasat" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2016

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu prof. Ing. Vojtěchovi Radovi, CSc a mému školiteli Mgr. Radkovi Pecharovi za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování mé bakalářské práce.

Charakterizace laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu divokých a domácích prasat

Souhrn

Mikrobiota trávicího traktu je považována za „získaný orgán“ umístěný v hostitelském organismu. Plní zde mnoho specifických funkcí. Složení mikrobioty se mění v průběhu života jedince v závislosti na jeho životním prostředí a výživě. Proces identifikace a charakterizace bakterií střevní mikrobioty je významnou podmínkou pro pochopení funkce tohoto „získaného orgánu“.

Tato práce se zabývá anatomií a fyziologií trávicího traktu (TT) prasat a evolučními a stravovacími odlišnostmi prasete divokého a domácího, pro pochopení přirozeného prostředí výskytu bakterií TT, které následně ovlivňuje diverzitu bakterií střevní mikrobioty. Zmíněn je i proces domestikace, který ovlivnil dnešní podobu prasete domácího. V práci je rozebírána charakteristika laktobacilů a bifidobakterií, která obsahuje jejich popis, taxonomii, metabolismus a prostředí jejich výskytu. Dále práce zmiňuje izolační média, užívaná v praxi pro izolaci bifidobakterií a laktobacilů z TT prasat, metody jejich identifikace a charakterizace.

Dostupná literatura potvrzuje rozdíly ve složení mikrobioty TT prasete divokého a domácího, s tím korelují i další studie, které studují různorodost mikrobioty dalších domestikovaných a divokých zvířat. Studium diverzity mikrobioty člověka např. ukazuje na širší druhové spektrum bakterií u primitivních kmenů člověka v porovnání s urbanizovaným člověkem.

Klíčová slova: prase divoké a domácí, trávicí trakt, střevní mikrobiota, laktobacily, bifidobakterie

Characterization of lactobacilli and bifidobacteria isolated from intestinal tract of wild and domesticated pigs

Summary

The microbiota of the gastrointestinal tract is considered as "acquired organ" located in a host organism. There are many performs of specific functions. The microbiota composition changes during the life of the individual, depending on his environment and nutrition. The process of identification and characterization of the bacteria from the intestinal microbiota is an important prerequisite for understanding the function of this "acquired organ".

This work deals with the anatomy and physiology of the digestive tract (DT) of pigs and evolutionary and eating differences of wild and domesticated pig, for understanding the natural environment of bacteria from DT, which in turn affects the bacterial diversity of the intestinal microbiota. Also mentioned is the process of domestication, which influenced the present form of domestic pig. The work includes the characteristics of lactobacilli and bifidobacteria, which contains the descriptions, taxonomy, metabolism and habitats. The work also shows the insulating media used in practice for the isolation of bifidobacteria and lactobacilli from DT of pigs and methods of their identification and related methods of characterization.

The available literature confirms the differences in the composition of microbiota DT between wild and domesticated pig, that correlate with other studies which study microbiota diversity of other domesticated and wild animals. The diversity studies of humans microbiota, also confirms the broad spectrum of bacterial species in primitive tribes of humans compared with urbanized man.

Keywords: wild and domesticated pig, digestive tract, intestinal microbiom, lactobacilli, bifidobacteria

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Obsah | 2 |
| 1 Úvod..... | 3 |
| 2 Cíl práce | 4 |
| 3 Literární přehled..... | 5 |
| 3.1 Prase (<i>Sus scrofa</i>)..... | 5 |
| 3.1.1 Biologie prasete | 5 |
| 3.1.2 Anatomie a fyziologie trávicího traktu prasete | 6 |
| 3.2 Prase divoké (<i>Sus scrofa</i>) a domácí (<i>S. scrofa f. domestica</i>)..... | 12 |
| 3.2.1 Domestikace | 12 |
| 3.2.2 Prase divoké vs. jeho domestikovaná forma..... | 12 |
| 3.3 Mikrobiota trávicího traktu prasete | 13 |
| 3.3.1 Mikrobiota TT prasete | 13 |
| 3.3.2 Mikrobiota domestikovaného prasete vs. divokého..... | 13 |
| 3.3.3 Bakterie rodu <i>Lactobacillus</i> a <i>Bifidobacterium</i> | 15 |
| 3.4 Izolace a kultivace laktobacilů a bifidobakterií z TT prasat | 21 |
| 3.4.1 Izolace a kultivace laktobacilů | 21 |
| 3.4.2 Izolace a kultivace bifidobakterií | 22 |
| 3.5 Identifikace laktobacilů a bifidobakterií z TT prasat | 23 |
| 3.5.1 Identifikace laktobacilů a bifidobakterií | 23 |
| 3.5.2 Molekulárně-genetické metody | 24 |
| 3.6 Charakterizace laktobacilů a bifidobakterií..... | 28 |
| 3.6.1 Fenotypické metody | 28 |
| 3.6.2 Genotypické metody | 30 |
| 4 Závěr | 32 |
| 5 Citovaná literatura..... | 33 |
| 6 Seznam použitých zkratk..... | 43 |

1 Úvod

Bakterie jsou nejpočetnějšími organizmy na naší planetě. Obývají mnoho ekosystémů, kde se realizují v koloběhu látek v přírodě, podílejí se na degradaci organických materiálů v půdě či plní důležité funkce v symbióze s dalšími organizmy. Jedním z příkladů takového symbiotického vztahu mezi bakteriemi a dalšími organizmy je mikrobiota trávicího traktu. Mikrobiota člověka může z celkové tělesné hmotnosti zaujímat 1,5 – 2 kg, což poukazuje na důležitost a funkčnost úlohy mikrobioty v hostitelském organizmu.

Prvním důležitým krokem pro pochopení mikrobioty TT, je proces identifikace bakterií na úroveň druhu a kmene, ke kterému v dnešní době slouží řada molekulárně-genetických metod. Dalším krokem pro pochopení vztahu mikrobioty TT a hostitele, je proces charakterizace izolovaných bakterií. V tomto procesu se zkoumá genotyp a fenotyp kmenů bakterií např. pomocí biochemických testů a modifikovaných molekulárně-genetických metod, které napomáhají vymezit odlišnosti mezi bakteriemi stejného druhu, poddruhu či na úrovni kmene.

Biochemické testy jsou založeny na rozdílné genetické výbavě a odlišné genové expresi jednotlivých kmenů bakterií. Genová exprese je ovlivněna podmínkami, ve kterých se bakterie nachází, proto je důležitá znalost složení a funkčních vlastností prostředí, ze kterého jsou kmeny bakterií izolovány. Při studiu bakterií izolovaných z trávicího traktu prasat je tedy podstatná také znalost anatomie a fyziologie TT i životního prostředí a výživy jejich hostitele, který tímto svoji mikrobiotu zpětně ovlivňuje.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo shrnout problematiku charakterizace vybraných bakteriálních rodů, konkrétně laktobacilů a bifidobakterií, izolovaných z trávicího traktu divokých a domácích prasat. Charakterizační metody dovolují sledovat specifické vlastnosti studovaných mikroorganismů, a tím umožňují hlubší pochopení vzájemných vazeb a úlohy střevní mikrobioty. Porozumění změnám, ke kterým dochází při domestikaci divokých prasat, je zajímavé také z hospodářského hlediska a je současně i tématem mé navazující výzkumné práce.

3 Literární přehled

3.1 Prase (*Sus scrofa*)

Sudý počet prstů, které jsou kryty kopytem, zařazuje prase do řádu sudokopytníků (Artiodactyla). Jednokomorový žaludek prasete jej začleňuje do podřádu nepřežvýkavých (Nonruminantia). Prase je dále řazeno do čeledi prasatovitých (Suidae). Tato čeleď vznikla přibližně před 30 miliony lety. Prase divoké a domácí jsou řazena do podčeledi pravých prasat (Suinae). V České republice se ve volné přírodě nejčastěji vyskytuje evropské prase divoké. Prase divoké (*Sus scrofa*) je nejčastěji uváděným předkem prasete domácího (*Sus scrofa* f. *domestica*), (Hespeler, 2007).

Chov prasete domácího patří celosvětově mezi nejvýznamnější odvětví živočišné výroby, ale i zemědělské výroby (Caras, 1999).

3.1.1 *Biologie prasete*

Průměrná délka prasete divokého se pohybuje mezi 110 – 155 cm, kohoutková výška bývá 80 – 110 cm. Hmotnost kanců bývá mezi 50 – 190 kilogramy a hmotnost bachyň se pohybuje kolem 35 – 160 kilogramy. Prase divoké má zavalité tělo s krátkýma nohama a protáhlou hlavou s výrazným rypákem. Lebka prasete divokého je robustní a klínovitá, sedící na silném a krátkém krku. Uši jsou dlouhé a vzpřímené. Kostra prasete divokého je přizpůsobena pro přerývání půdy. Velmi výrazné jsou špičáky, přeměněné v kly. Zbarvení prasete divokého je nejčastěji tmavě hnědé až černé. Kůže je kryta kadeřavou srstí, která je složena ze štětín a podsady. Pohlavní dospělost u bachyň nastává v 6. až 8. měsíci věku, u samců nastává později v 8. až 11. měsíci. Březost bachyň trvá v rozmezí 112 – 119 dnů a bachyně vrhne v průměru 2 – 6 selat. Životní prostředí prasete divokého tvoří nejčastěji lesy mírného pásu (Hespeler, 2007).

Strava prasete divokého je různorodá obsahuje vyšší procento potravy živočišného původu (např. hmyz, kroužkovci, obojživelníci, drobní hlodavci) a tvoří ji také houby. Potrava rostlinného původu je nejčastěji tvořena plody lesních dřevin (např. žaludy, bukvice, kaštany) a polními plodinami (např. kukuřice, řepa, brambory). U prasete divokého byl sledován i kanibalismus (Diller, 2002; Hespeler, 2007).

Velikost prasete domácího v porovnání s prasetem divokým výrazně kolísá, hmotnost se pohybuje mezi 30 – 400 kg, délka v rozmezí 90 – 250 cm, kohoutková výška mezi 30 – 90 cm. Hlava prasete domácího vybíhá v nápadný rypák, tvar lebky bývá proměnlivý dle plemena, např. klínovitý, sedlovitý, barva kůže je také proměnlivá – od růžové, bílé, strakaté, rezavé, šedé až po černou. Kůže bývá zpravidla lysá nebo je pokryta řídkými štětinami, ale existují plemena, kde může být srst hustá a kadeřavá. Velikost uší a tvar ušního boltce bývá odlišný dle plemena prasete domácího – např. uši vzpřímené, klopené, zašpičatělé, oválné. Konstituce se odvíjí od plemene prasete domácího. Pohlavní dospělost u prasnic bývá ve 3 měsících věku, u kanců nastupuje v 5 měsících věku. Březost trvá 110 – 120 dní a prasnice vrhne v průměru 8 – 14 mláďat (Stupka a kol., 2013).

Prase domácí je v dnešní době nejčastěji chováno v intenzivních chovech, kde je mu předkládána krmná směs, ve které převládají rostlinné složky. Hlavní součástí krmné směsi jsou obiloviny (např. pšenice, oves, ječmen), olejniný (např. extrahovaný šrot z řepky, sóji, slunečnice), v malém množství luskoviny (např. hrách setý, lupina sladká, vikev setá), v minimálním množství krmná aditiva (např. syntetické AMK) a živočišné moučky (pouze rybí), (Stupka a kol., 2013).

3.1.2 Anatomie a fyziologie trávicího traktu prasete

3.1.2.1 Dutina ústní (*Cavum oris*)

Dutina ústní je začátkem trávicí trubice, po stranách je ohraničena tvářemi, strop je tvořen tvrdým patrem a ke spodině dutiny ústní je připojen jazyk, který ji vyplňuje. Celá dutina ústní je vystlána sliznicí s vícevrstevným rohovatějícím dlaždicovým epitelem. Horní a dolní zubní oblouk a dásně vymezují ústní předsíň od vlastní dutiny ústní. Kaudálně se dutina ústní mění v hltan, jehož konec je ohraničen ze shora jazykopatrovým obloukem a dole kořenem jazyka. Ústní štěrbina je ohraničena pysky (*labia oris*), které spolu s ní utvářejí ústa (Marvan a kol., 2011). V dutině ústní se nachází chrup.

Trvalý chrup prasete je tvořen 44 zuby (mléčný chrup 28 zubů). Moláry jsou kryty silně diferencovanými sklovinnými hrboly (König a Liebich, 2002). Řezáky jsou nepravidelně uspořádány, mají různou velikost a mají mezi sebou viditelné mezery. Špičáky jsou silné, u

kanců mají charakteristickou podobu klů, vyčnívajících z dutiny ústní a silněji je vyvinut dolní špičák dlouhý až 18cm (Marvan a kol., 2011).

Dalším důležitým orgánem dutiny ústní je jazyk. Jazyk je svalnatý orgán, vyznačující se zvláštním uspořádáním svaloviny, které mu propůjčuje velkou ohebnost. Na jazyku jsou přítomny slizniční hrboly, ve formě jazykových papil (*papillae linguales*), z nichž některé papily jazyka obsahují chuťové pohárky, v jejichž bezprostřední blízkosti se nacházejí serózní vyplachovací žlázy (Ebnerovy žlázy), (König a Liebich, 2002). V dutině ústní jsou přítomny slinné žlázy. Malé slinné žlázy se ve velkém počtu nacházejí ve sliznici pysků, tváří, jazyka a patra, vylučují hlavně mucinózní sekret. Velké slinné žlázy (příušní slinná žláza, podčelistní slinná žláza), (König a Liebich, 2002).

3.1.2.2 Hltan (*Pharynx*)

Hltan je situován v místě, kde se kříží dýchací a trávicí cesty. Leží mezi dutinou ústní a jícnem. Stěny hltanu jsou tvořeny svaly, které během procesu polykání zužují a zkracují svěrače hltanu. Hltan spolu se svaly jazyka umožňuje proces polykání (König a Liebich, 2002).

3.1.2.3 Jícen (*Esophagus*)

Jícen je pokračováním trávicího traktu od hltanu směrem k žaludku (König a Liebich, 2002). U jícnu můžeme rozlišit tři části, jsou to krční, hrudní a břišní část jícnu. Tyto části se od sebe liší svým průběhem a obsahem příčně pruhovaných svalových vláken, kde v poslední jícnové části jsou nahrazeny hladkou svalovinou. Stěna jícnu má charakter základní stavby trávicí trubice. Sliznice je vysoká a vystýlá ji vícevrstevný dlaždicový epitel, který rohovatí. Podslizniční tkáň obsahuje mnoho hlenových žláz. U prasete zasahují hlenové žlázy až do poloviny jícnu (Marvan a kol., 2011).

3.1.2.4 Žaludek (*Gaster*)

Žaludek je vakovitý orgán, uložený v břišní dutině mezi jícnem a tenkým střevem v levé polovině brániční kopule a jeho vrátníková část zasahuje až do pravé poloviny břišní. Žaludek prasete má jednotnou dutinu, proto se řadí mezi jednodukomorový typ. Obsahuje žláznatou i bezžláznatou kutánní sliznici, což je typické pro složitý žaludek (prase, kůň). Tělo žaludku se člení na dno žaludku (*fundus ventriculi*), česlovou část (*pars cardiaca*) žaludku a vrátníkovou

část (*pars pylorica*) žaludku. V česlové části ústí do žaludku jícen, – tato část je tvořena bělavou kutánní sliznicí, zbývající části žaludku jsou tvořeny narůžovělou sliznicí, která obsahuje jednotlivé žaludeční žlázy. Žaludek je zakončen vrátníkem (*pylorus*), který je tvořen neúplným svěračem a vrátníkovým svalovým valem, vrátník odděluje žaludek od dvanácterníku. Povrch žaludeční sliznice kryje jednovrstevný cylindrický epitel, který má žlázo- vý charakter (Marvan a kol., 2011).

3.1.2.5 Střevo (*intestinum*)

Střevo představuje nejdelší oddíl trávicí trubice (Marvan a kol., 2011). Střevo začíná kaudálně od vrátníku žaludku a ústí do řitě. Jako tenké střevo (*intestinum tenue*) se označuje oddíl mezi vrátníkem a slepým střevem, jako tlusté střevo (*intestinum crasum*) oddíl od slepého střeva až k řiti (*anus*), (König a Liebich, 2002).

- Stavba střeva

Střevní stěna je složena směrem od vnitřního povrchu k vnějšímu z následujících vrstev:

- **sliznice** (*tunica mucosa*),
- **podslizniční vrstva** (*tela submucosa*),
- **svalová vrstva** (*tunica muscularis*),
- **pobříšnice** (*tunica serosa*).

Střevní sliznici kryje jednovrstevný cylindrický epitel (enterocyty). V celé střevní trubici jsou do *lamina propria mucosae* (vrstva sliznice tvořená vazivem) vnořené rovné, nerozvětvené tubulózní žlázy (Lieberkühnovy krypty).

Povrch sliznice tenkého střeva je zvětšen prokrvenými střevními klky (*villi intestinales*), které významně přispívají k zvětšení resorpční plochy střeva.

Podslizniční vrstva je tvořena řídkým vazivem. Obsahuje krevní a mízní cévy, částečně lymfatické uzlíčky a vegetativní nervové pleteně.

Svalová vrstva je tvořena z tlustší vnitřní cirkulární a slabší vnější podélné svaloviny. Vnější podélná vrstva svaloviny je u prasat soustředěna v tzv. *teniae*, mezi nimiž se střevní stěna vyzvedává vně a vytváří střevní výdutě (*haustra*).

Vrstva pobříšnice utváří výstelku břišní dutiny (*peritoneum*) a vnější povlak střeva (König a Liebich, 2002).

- Tenké střevo (*intestinum tenue*)

Tenké střevo prasete dosahuje délky 10 – 20 m (Marvan a kol., 2011). Sliznice tenkého střeva obsahuje ve svém epitelu buňky resorpční, buňky produkující hlen a endokrinní buňky. V určitých částech tenkého střeva jsou obsaženy lymfatické uzlíčky, které jsou nazývány Peyeroovy plaky, jejichž četnost výskytu stoupá se snižující se vzdáleností od přechodu do tlustého střeva.

Části tenkého střeva jsou:

- **dvanáctník** (*duodeum*)
- **lačník** (*jejunum*)
- **kyčelník** (*ileum*)

Dvanáctník je u prasete na rozdíl od koně a přežvýkavců dlouhý (15 – 20 cm), ústí do něj vývod žlučníku a pankreatu na příslušných bradavkách (König a Liebich, 2002). Dvanáctník je připevněn krátkým okružím k stěně dutiny břišní, to omezuje jeho pohyblivost.

Lačník je nejdelším úsekem tenkého střeva a nejdůležitější částí z hlediska vstřebávání a trávení živin. Je charakteristický tvorbou kliček. Jeho délka u prasete činí 13 – 18 m.

Kyčelník u prasete měří asi 0,4 m, je nejkratší částí tenkého střeva, nevytváří kličky. Ústí kyčelníkovým otvorem do slepého střeva, vyústění uzavírá kyčelníkovým svěrač (Marvan a kol., 2011).

- Tlusté střevo (*intestinum crassum*)

Tlusté střevo začíná při kyčelníkovém otvoru slepého střeva a končí řitním otvorem (Marvan a kolektiv, 2011). Dokončují zde trávení enzymy tenkého střeva a obsah je vystaven mikrobiální činnosti. Dochází zde ke vstřebávání vody, produktů cukerného kvašení a částečně ke vstřebávání elektrolytů a dusíkatých látek (Jelínek, 2003).

U všech zvířat můžeme rozlišit tyto části:

- **slepé střevo** (*cecum*)
- **tračník** (*colon*)
- **konečník** (*rectum*), (König a Liebich, 2002).

Slepé střevo je charakteristické slepým zakončením, u prasete je široké a krátké, jeho objem činí 1,5 – 2,5 l.

Tračník se člení dle průběhu na vzestupný, příčný a sestupný. U prasete vytváří vzestupný tračník tzv. tračnickový labyrint (dvojitá kuželová spirála).

Konečník je koncový úsek tlustého střeva, dochází zde k hromadění nestrávených zbytků potravy a umožňuje defekaci (Marvan a kol., 2011).

3.1.2.6 Přídavné trávicí žlázy

Do této kategorie se řadí játra (*hepar*), slinivka břišní (*pankreas*). Játra jsou největší žlázou v těle. Plní mnoho funkcí, z nichž pro trávení je nejdůležitější tvorba žluči a metabolismus sacharidů, lipidů a bílkovin. Slinivka břišní je tubuloalveolární žláza se schopností endokrinního a exokrinního vylučování, kdy v trávení hraje nejpodstatnější roli exokrinní vylučování, tedy tvorba pankreatické šťávy (Jelínek, 2003).

3.1.2.7 Shrnutí fyziologie trávicí soustavy prasete

Funkcí trávicího ústrojí je příjem a zpracování potravy tak, aby mohla být využita pro stavbu a regeneraci somatických buněk a aby současně organismu poskytla nezbytnou energii. Potrava je proto v různých částech trávicího traktu mechanicky rozmělněna a chemicky rozložena. Nepoužitelné složky potravy jsou trávicím traktem z těla vyloučeny. Do jednotlivých částí trávicího ústrojí jsou vylučovány sekrety ze zmiňovaných přídavných žláz (Liebich, 2002).

Proces trávení začíná v dutině ústní, kde je potrava mechanicky za pomoci zubů, jazyka a žvýkacích pohybů rozmělněna a promísena se slinami (pH 7,2 – 7,5), které obsahují enzymy maltasu (štěpí maltosu na glukosu), α -amylasu, která zahajuje trávení škrobu. Prase denně vyprodukuje 10 – 15 litrů slin (Jelínek a kol., 2003).

Proces trávení po spolknutí sousta pokračuje v žaludku, kde je potrava mechanicky pomocí pohybů žaludku promísena se žaludeční šťávou, která obsahuje kyselinu chlorovodíkovou (HCl), která je produkována v krycích buňkách vlastních žaludečních žláz. Funkcí HCl je aktivizace pepsinogenu, denaturace bílkovin, bobtnání vaziva, ochrana hydrofilních vitamínů před jejich znehodnocením, umožnění využití Ca a Fe, má baktericidní účinek, stimuluje vylučování sekretinu a dalších intestinálních hormonů, tlumí vylučování gastrinu. Aktivní forma pepsinogenu je pepsin, který působí proteolyticky (štěpí peptidy v místě fenylalaninu a dikarboxylových kyselin) za vzniku vyšších polypeptidů, jejichž

trávení pokračuje až v tenkém střevě, pepsin rovněž sráží mléko. Buňky žaludku produkují vnitřní faktor (glykoprotein), který vytváří komplex s vitamínem B12 (chrání jej před rozštěpením), který je vstřebán v kyčelníku. Žaludkem je rovněž produkován gastroferrin, glykoprotein, který umožňuje resorpci železa. V žaludku dále pokračuje trávení škrobu α -amylasou. Trávenina (pH 2,5 – 3) ze žaludku pokračuje vrátníkem do dvanáctníku (Reece, 2011).

V tenkém střevě má nejvýznamnější roli v trávení pankreatická šťáva (pH 7.2 – 8,5), za 24 hodin jí prase vyprodukuje asi 7,0 – 8,0 litrů. Nejaktivnějším proteolytickým enzymem pankreatické šťávy je trypsin, štěpí bílkoviny mezi aminokyselinou argininem a lyzinem a je schopen štěpit některé dipeptidy na aminokyseliny. Dalším enzymem pankreatické šťávy je elastasa, která je schopna štěpit elastin (protein vazivových tkání), který odolává působení jiných proteáz. Karboxypeptidáza dokončuje rozklad peptidů na jednotlivé aminokyseliny. Nukleázy štěpí nukleové kyseliny na jednotlivé nukleotidy. Pankreatická lipasa (steapsin) se podílí na štěpení tuků, kdy štěpí triacylglyceroly v pozici 1 a 3 na monoacylglyceroly, případně až na glycerol a mastné kyseliny, za pomoci enzymu kolipasy. Pankreatická fosfolipasa štěpí lecitin na mastné kyseliny a kyselinu fosforečnou. Pankreatická cholesterolesterasa štěpí estery cholesterolu a další lipidové estery (estery vitamínů A, D, E). Pankreatická amylasa štěpí škrob a glykogen (v 1-4 glykosidické vazbě) přes dextriny a maltotriosu na maltosu (Jelínek a kol., 2003; Reece, 2011).

Další šťávou, která napomáhá trávení, je žluč, která umožňuje fyziologický průběh trávení a vstřebávání tuků a zároveň vylučování látek z organismu. Žluč obsahuje NaHCO_3 , který se podílí na úpravě pH žluče a obsahu tenkého střeva. Žluč zajišťuje neutralizaci kyselého prostředí ve dvanáctníku, tím napomáhá vytvořit ideální podmínky pro aktivitu pankreatických enzymů, emulguje tukové kuličky, umožňuje vstřebávání mastných kyselin, resorpci vitamínu D, má baktericidní a detoxikační účinky (Reece, 2011).

Tenké střevo produkuje také vlastní střevní šťávu, která obsahuje tyto enzymy: enteropeptidasa (aktivuje enzymy pankreatické šťávy), peptidasy (směs proteolytických enzymů, které štěpí nižší peptidy na volné aminokyseliny), nukleotidasy (odštěpují H_3PO_4 za vzniku nukleosidů), nukleosidasy (rozkládají nukleosidy na pyrimidinové a purinové báze a pentosu), střevní lipasa (podobná funkce jako pankreatická lipasa), lecitinasa (rozštěpuje lecitin na glycerol, mastné kyseliny, H_3PO_4 a cholin), disacharidasy štěpí disacharidy (maltosa, laktosa, sacharasa) na jednoduché cukry (glukosa, galaktosa, fruktosa). V tenkém střevě dochází k největší resorpci živin.

Z tenkého střeva pokračuje trávenina dále do tlustého střeva, kde dochází k zahuštění (zpětná resorpce vody) nestrávených zbytků potravy a tvorby konečné stolice, která pak odchází z těla přes konečník. Dochází zde i k fermentačním a detoxikačním procesům pomocí mikrobioty střeva (Jelínek a kol., 2003).

3.2 Prase divoké (*Sus scrofa*) a domácí (*S. scrofa f. domestica*)

3.2.1 Domestikace

Domestikace je definována jako proces, při kterém dochází ke změně v genotypu a fenotypu zvířat či rostlin v závislosti na selekčním tlaku spojeným s životem pod dohledem člověka (Jensen a Wright, 2014).

Počátky domestikace prasete divokého jsou autory nejčastěji řazeny do období 7000 – 4000 let před naším letopočtem. Archeologické nálezy kosterních pozůstatků byly nalezeny i z dřívější doby, není ale jisté, zda se jednalo o zvířata ulovená či domestikovaná. Jsou rozlišována 3 hlavní centra domestikace: oblast jižní Evropy (domestikace prasete páskovaného), oblast v okolí Baltského moře (domestikace z prasete divokého v jeho čisté formě) a oblast východní Asie (domestikace probíhala rovněž z prasete páskovaného), (Hanslian, 1925). Lega et al. (2016) uvádí, že prase divoké bylo domestikováno 10 500 let před naším letopočtem v oblasti „Úrodného půlměsíce“ (oblast dnešního Íráku, Sýrie, Libanonu, Jordánska a Izraele) a z této oblasti neolitičtí farmáři šířili domácí prasata směrem na západ do Evropy. Neolitičtí farmáři dovedli domácí prasata z Blízkého východu do Evropy 6 000 let před naším letopočtem, prostřednictvím tzv. Podunajské cesty. Přibližně 3 900 let před naším letopočtem bylo evropské prase divoké lokálně domestikováno a rozšířeno po celé Evropě i na Blízký východ (Larson et al., 2007).

3.2.2 Prase divoké vs. jeho domestikovaná forma

Procesem domestikace došlo k frontálnímu zkrácení lebky, zkrácení patra a zmenšení velikosti a plochy zubů, změnila se barva a hustota srsti, či došlo k její redukci (Owen et al., 2014, Evin et al., 2016). Uhr (1995) zjistil, že prase domácí má v průměru o 28 % delší střevo než prase divoké, nejvíce rozdílná je délka a plocha tenkého střeva, která je u prasete domácího větší. Zajímavé je, že bazální metabolismus prasete divokého je přibližně 3 x větší

(přepočteno na 100 kg váhy) než u prasete domácího, ačkoliv má divoké menší tenké střevo než prase domácí. Tyto rozdílnosti v anatomii střeva autor připisuje právě procesu domestikace.

3.3 Mikrobiota trávicího traktu prasete

3.3.1 Mikrobiota TT prasete

Mikroorganismy, které obývají trávicí trakt, jsou označovány jako mikrobiota trávicího traktu. Složení této mikrobioty je hostitelsky specifické a vyvíjí se v průběhu života jedince. Střevní mikrobiota může být považována za „získaný orgán“ umístěný v hostitelském organismu (Bäckhed et al., 2005). Tento „orgán“ je úzce spojený s mnoha procesy přirozené hostitelské fyziologie od nutričního stavu po chování a reakce na stres: to zahrnuje trávení, zásobení a přerozdělování energie prostřednictvím fyziologicky důležitých chemických přeměn, které mohou zahrnovat autoreplikaci až po sebeobnovu (Bäckhed et al., 2005; Sekirov et al., 2010) Ve společenství převládají anaerobní bakterie, které přeměňují rostlinné polysacharidy a nestravitelné složky hostitelské potravy, jako je celulóza, hemicelulóza či rezistentní škrob na jednoduché cukry, mastné kyseliny s krátkým řetězcem a jiné živiny prospěšné pro hostitele. Hostitel poskytuje mikroorganismům živný substrát bohatý na polysacharidy v anaerobním prostředí a zpětně má přístup ke zdroji uhlíku a energii ze symbiotických přeměn (Bäckhed et al., 2004; Bäckhed et al., 2005).

Nejvyšších počtů dosahují bakterie v slepém a tlustém střevu – až 11 log CFU/g. Ve slepém střevu dominují spíše gramnegativní bakterie, zatím co v tlustém střevu početnější grampozitivní bakterie (Robinson a kol., 1981; Salanitro a kol., 1977). Z bakterií mléčného kvašení zde dominují hlavně rody *Lactobacillus*, *Bacteroides*, a *Clostridium* (Jonsson a Conway, 1992). Rod *Bifidobacterium* se zde vyskytuje pravidelně, ale v relativně nízkých počtech (Mikkelsen et al., 2003; Rada a Marounek, 2005).

3.3.2 Mikrobiota domestikovaného prasete vs. divokého

Pajarillo et al. (2014) studoval diverzitu střevní mikrobioty tří plemen prasete domácího (Duroc, Landrace a Yorkshire), kde plemeno Landrace mělo rozmanitější složení bakteriálního společenstva než ostatní studovaná plemena. Rod *Lactobacillus* měl nejhojnější

výskyt u plemena Landrace, nižší výskyt byl zaznamenán u plemene Yorkshire a Duroc. Nutno podotknout, že studovaná plemena měla stejnou dietu, věk i způsob porodu.

Ushida et al. (2015) provedl studii, kde porovnával zastoupení bakteriálních populací střevní mikrobioty prasete domácího a prasete divokého. Hodnoty relativní abundance vzhledem k celkové diverzitě mikrobiomu TT prasete jsou zaznamenány v Tabulce 1.

Tabulka 1: Relativní abundance vybraných rodů bakterií upraveno dle Ushida et al. (2015)

| Původ izolátů | Sledované rody bakterií | Relativní abundance (%) |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| Prase divoké (volně žijící) | <i>Lactobacillus</i> | 1,4 |
| | <i>Bifidobacterium</i> | 2,4 |
| Prase divoké (chov v zajetí) | <i>Lactobacillus</i> | 14,5 |
| | <i>Bifidobacterium</i> | 1,1 |
| | | |
| Prase domácí (evropská plemena) | <i>Lactobacillus</i> | 15,2 |
| | <i>Bifidobacterium</i> | 1,1 |

Z hodnot je patrné, že nejvyšší hojnost zastoupení bakterií rodu *Lactobacillus* zaujímá prase domácí. Autor předpokládá, že zvýšená abundance u rodu *Lactobacillus* je způsobena vyšším obsahem škrobu v potravě domácích prasat, kterým jsou v chovech předkládána krmiva bohatá na obiloviny.

Naopak je tomu u bakterií rodu *Bifidobacterium*, kde je relativní abundance vyšší u volně žijících prasat divokých. Zajímavé jsou hodnoty u prasete divokého chovaného v zajetí, které se přibližují hodnotám zjištěným u prasete domácího.

Diverzita bakteriálního mikrobiomu byla nalezná i u jiných savců a ptáků, ale také např. korýšů aj., (Bacanu a Oprea, 2014; Rungrassamee et al., 2014; Scupham et al., 2008).

Odlišnosti ve spektru bakteriálního mikrobiomu TT byly zjištěny i u lidské populace. Kwok et al. (2014) analyzoval mikrobiom TT 7 etnických skupin Číňanů, kde na základě odlišného zastoupení bakterií naznačuje, že etnický původ může mít významnou roli při vytváření diverzity lidského střevního mikrobiomu. Podobně se zabývali studiem lidské střevní mikrobioty i Schnorr et al. (2014), kteří porovnávali diverzitu mikrobiomu TT afrických lovců kmene Hadza, s mikrobiomem italského obyvatelstva. Zaznamenali podstatně vyšší rozmanitost střevního mikrobiomu u lovců Hadza oproti městským Evropanům. Zajímavá zde byla absence bakterií rodu *Bifidobacterium* u příslušníků afrického kmene.

Autoři vysvětlují tyto významné odlišnosti výživou a stylem života, který se u sledovaných Afričanů blíží způsobu života člověka z období paleolitu. Tato studie může poskytnout vhled do vývoje lidského mikrobiomu před obdobím neolitické revoluce, která souvisela se změnou způsobu života lidí.

3.3.3 Bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*

Rod *Lactobacillus* byl poprvé popsán Beijerinckem v roce 1901. Roku 1919 Orla-Jensen na základě teploty růstu, morfologických a fenotypických vlastností, rozdělil tento rod do 3 skupin: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* a *Betabacterium* (Bernardeau et al. 2006; Klein a kol. 1998).

Bifidobakterie poprvé izoloval Henry Tissier v roce 1899 v Pasterově institutu z fekálií kojenečích dětí. Původní jméno *Bacillus bifidus communis* (Tissier, 1900) označovalo větvení v morfologii bakterie (*bifidus* = rozštěp na dvě části), (Ishibalshi, 1997). Orla-Jensen (1924) poprvé navrhl klasifikovat *Bacillus bifidus* jako samostatný druh pod rodovým jménem *Bifidobacterium*, díky využití nových identifikačních metod, založených na enzymatických a metabolických charakteristikách (Felis et al., 2007). Bifidobakterie by tedy měly tvořit samostatný rod, který by vytvářel spojení mezi bakteriemi mléčného a propionového kvašení (Jensen, 1924). Definitivně byl rod *Bifidobacterium* oddělen od rodu *Lactobacillus* až v roce 1957 na základě specifických fermentačních vlastností (Dehnart, 1957).

3.3.3.1 Charakteristika bakterií rodu *Lactobacillus*

Laktobacily jsou zařazovány do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, čeledi *Lactobacillaceae*. Tato čeleď zahrnovala 3 rody: *Lactobacillus* (218 druhů), *Paralactobacillus* (1 druh) a *Pediococcus* (15 druhů). Jediný zástupce *Paralactobacillus selanogensis* z rodu *Paralactobacillus*, byl v roce 2011 přerazen do rodu *Lactobacillus* pod novým jménem *Lactobacillus selanogensis*, tímto tento rod zanikl a čeleď *Lactobacillaceae* obsahuje po reklasifikaci pouze 2 rody (Haakensen et al., 2011). Do čeledi byly tyto bakterie zařazeny na základě fylogenetické analýzy genových sekvencí 16S rRNA (komponenta 30S malé podjednotky prokaryotických ribozomů), (Garrity et al., 2004; Felis et al., 2007). Bakterie této čeledi mohou mít dlouhý a štíhlý tvar, někdy mohou mít tvar ohnutých tyčinek až po koryneformní pediokoky (kulovité buňky). Mohou tvořit řetízky, s výjimkou pediokoků, kteří utvářejí páry nebo tetrády. Obvykle u nich převládá sacharolytický způsob

výživy, kdy jako konečný produkt fermentace, alespoň z poloviny, vzniká kyselina mléčná. Případně může vznikat také acetát, ethanol, CO₂, formiát či sukcinát. Laktobacily obvykle vykazují negativní katalasu (některé kmeny mohou produkovat pseudokatalasu) a cytochrom-oxidaseovou aktivitu (Winslow et al., 1917). U některých druhů, byla zjištěna pseudokatalasová aktivita (Felis a Dellaglio, 2007). Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou mikroaerofilní, grampozitivní, nesporulující.

Tento bakteriální rod je náročný na přítomnost různých aminokyselin, peptidů, vitamínů, solí, mastných kyselin či jejich esterů a sacharidů, a proto jsou místa jejich výskytu velmi rozmanitá. Často je nacházíme v potravinách (mléčné výrobky, fermentované masné výrobky, těsta, fermentovaná zelenina, ovoce či nápoje), také byly nalezeny v respirační, gastrointestinální, genitální soustavě člověka a zvířat, v odpadních vodách a rostlinných materiálech (Felis a Dellaglio, 2007).

Laktobacily ve své buněčné stěně obsahují peptydoglykan, liší se složením dipeptidů – nejčastěji obsahují lysin a D-asparagin (Schleifer a Kandler, 1972), u některých druhů bývá lysin nahrazen ornitinem, příp. asparagin je nahrazen alaninem (ten se může vyskytovat ve dvou typech). V buněčné stěně se vyskytují extracelulární polysacharidy – obvykle jsou jimi dextran, glukan a levan (Tieking et al., 2003).

Taxonomie rodu *Lactobacillus* byla dlouhou dobu založena na jejich fenotypických vlastnostech jako je: fermentační profil cukrů, odolnost vůči různé koncentraci NaCl, růst v různých mediích za definované teploty, odolnost vůči antibiotikům, složení buněčné stěny (Klein et al., 1998). Původně byly seskupeny dle teploty růstu a způsobu fermentace hexos s důrazem na jejich homo/heterofermentativní aktivitu (Orla-Jensen, 1919). Později bylo přijato nové rozdělení na základě typů fermentovaných substrátů a produktů fermentace (Hammes a Hertel, 2009).

Dle typu fermentace se bakterie rodu *Lactobacillus* dělí na:

- **Obligátně homofermentativní** – fermentují hexosy výhradně na kyselinu mléčnou, glukonát ani pentosy nefermentují. Do této skupiny se řadí tyto druhy např.: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. amylophilus*, *L. helveticus* (Klein et al. 1998).
- **Fakultativně heterofermentativní** – fermentují hexosy na kyselinu mléčnou či směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu. Pentosy fermentují na kyselinu octovou a mléčnou. Do této skupiny se řadí např. druhy: *L.*

acetotolerans, *L. casei*, *L. paraplantarum*, *L. sakei*, *L. intestinalis*, *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*. (Klein et al. 1998).

- **Obligátně heterofermentativní:** – fermentují hexosy na kyselinu mléčnou, octovou, ethanol a CO₂. Pentosy fermentují na kyselinu octovou a mléčnou. Do této skupiny se řadí tyto druhy např.: *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. fructosus*, *L. kefir*, *L. rauteri*, *L. vaginalis* (Klein et al. 1998).

Dle nejnovějších fylogenetických analýz jsou bakterie rodu *Lactobacillus* rozčleněny do 15 skupin, které nesou název podle hlavního druhu této skupiny. Jsou jimi *Lactobacillus delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. collinoides*, *L. fructivorans*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. manihotivorans*, *L. perolens* a *L. vaccinoferus* (Salveti et al., 2012).

Z trávicího traktu prasat byly izolovány například druhy: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. panis*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. ruminis*, *L. reuteri*, *L. mucosae*, *L. agilis*, *L. saerimneri*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *L. salivarius* subsp. *salinicus*, *L. sharpae*, *L. vaginalis* (Bolado-Martínez et al., 2012). Uvedené druhy (vyjma samostatně stojícího druhu *L. sharpae*) spadají do 5 výše citovaných skupin (a jsou ve výčtech dalších druhů těchto skupin zvýrazněny tučně):

- skupina ***Lactobacillus delbrueckii*** (*L. acetotolerans*, ***L. acidophilus***, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophobicus*, ***L. amylovorus***, ***L. crispatus***, ***L. delbrueckii***, *L. equicursoris*, *L. fornicalis*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. gigeriorum*, *L. hamsteri*, *L. helveticus*, *L. hominis*, *L. iners*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, ***L. johnsonii***, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens*, *L. kitasatonis*, *L. pasteurii*, *L. psittaci*, *L. taiwanensis*, *L. ultunensis*)
- skupina ***L. salivarius*** (*L. acidipiscis*, ***L. agilis***, *L. animalis*, *L. apodemi*, *L. aquaticus*, *L. aviarius*, *L. cacaonum*, *L. capillatus*, *L. ceti*, *L. equi*, *L. ghanensis*, *L. hayakitensis*, *L. hordei*, *L. mali*, *L. murinus*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. pobuzihi*, ***L. ruminis***, ***L. saerimneri***, ***L. salivarius***, *L. sucicola*, *L. satsumensis*, *L. uvarum*, *L. vini*)
- skupina ***L. reuteri*** (*L. alvi*, *L. antri*, *L. coleohominis*, ***L. fermentum***, *L. frumenti*, *L. equigenerosi*, *L. gastricus*, *L. ingluviei*, ***L. mucosae***, *L. oris*, ***L. panis***, ***L. pontis***, ***L. reuteri***, *L. secaliphilus*, ***L. vaginalis***)
- skupina ***L. brevis*** (*L. acidifarinae*, ***L. brevis***, *L. hammesii*, *L. koreensis*, *L. namurensis*, *L. parabrevis*, *L. paucivorans*, *L. senmaizukei*, *L. spicheri*, *L. zymae*)
- skupina ***L. plantarum*** (*L. fabifermentans*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, ***L. plantarum***, *L. xiangfangensis*)

Metabolizmus obligátně homofermentativních a obligátně heterofermentativních spojuje počáteční substrát, který využívají, a tím je glukosa. U obligátně homofermentativních bakterií je glukosa fosforylována a izomerována na fruktosu-6-fosfát a následně na fruktosa-1,6-bisfosfát, který je přeměněn na glycerinaldehyd-fosfát a ten je následně odbourán na 2 molekuly pyruvátu za vzniku 4 molekul adenosintrifosfátu (ATP) a 2 molekul redukovaného nikotinamidadeninukleotidu (NADH), 2 molekuly pyruvátu jsou následně odbourány enzymem laktátdehydrogenasou na 2 molekuly kyseliny mléčné (Hofvendahl a Hahn–Hägerdal, 2000).

U obligátně heterofermentativních laktobacilů je glukosa fosforylována na glukosa-6-fosfát a následně oxidována na glukonát-6-fosfát, pak je procesem dekarboxylace, za uvolnění CO₂, přeměněn na xylulosa-5-fosfát, která je dále degradována na glycerinaldehyd-fosfát a acetyl-fosfát; glycerinaldehyd-fosfát je podobně, jako u obligátně homofermentativních laktobacilů odbouráván na kyselinu mléčnou, přes pyruvát s rozdílem energetického zisku, který je zde poloviční. Acetyl-fosfát je dále odbouráván buď na etanol či acetát (Hofvendahl a Hahn–Hägerdal, 2000).

U fakultativně fermentativních laktobacilů je jejich specifický způsob fermentace využíván při nedostatku glukosy v substrátu a bakterie pak tedy využívá další sacharidy. Kromě kyseliny mléčné zde vzniká také etanol, formiát a acetát, ale oproti homofermentativní dráze se odlišují produkty z odbourávání pyruvátu, kde není metabolizována pouze kyselina mléčná, ale i formiát a acetyl-koenzym A (acetyl-CoA). Acetyl-CoA vzniká činností enzymu pyruvát-formiát lyasy, který je za přítomnosti kyslíku neaktivní, proto je aktivována alternativní metabolická dráha, kdy je pyruvát metabolizován pomocí enzymu pyruvátdehydrogenasy, za vzniku CO₂, acetyl-CoA a NADH. Acetyl-CoA je později odbouráván na acetát a etanol (Hofvendahl a Hahn–Hägerdal, 2000).

3.3.3.2 Charakteristika bakterií rodu *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou řazeny do kmene *Actinobacteria* do čeledě *Bifidobacteriaceae*, která zahrnuje 6 bakteriálních rodů – jsou jimi: *Aeriscardovia* (1 druh), *Alloiscardovia* (3 druhy), *Bifidobacterium* (51 druhů), *Gardnerella* (1 druh), *Parascardovia* (2 druhy) a *Scardovia* (2 druhy), (Goodfellow et al., 2012; German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

Všechny druhy této čeledi spojuje aktivita specifického enzymu fruktosa-6-fosfát fosfoketolasy (F6PPK).

Bifidobakterie jsou grampozitivní, vytvářejí polymorfni rozvětvené tyčinky, které se vyskytují samostatně či v řetězcích nebo shlucích. Buňky jsou nesporeující, nepohyblivé a netvoří vlákna. Jsou striktně anaerobní, ale některé kmeny tolerují kyslík za přítomnosti CO₂. Druh *Scardovia coaguans* izolovaný z trávicího traktu čmeláků je schopen růstu v aerobním prostředí. Druhy *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. indicum* jsou schopny růstu v mikroaerofilních podmínkách (Killer, 2008). Bifidobakterie jsou chemoorganotrofní – využívají energii ze štěpení organického materiálu. Štěpením různých sacharidů vytvářejí kyseliny bez produkce plynu. Katalasový test je u nich negativní – až na několik výjimek (*B. indicum* a *B. asteroides*) jsou-li kultivovány za přítomnosti vzduchu (Simpson et al., 2004a; Felis et al., 2007).

Bifidobakterie mají typickou stavbu buněčné stěny charakteristickou pro grampozitivní bakterie, stěna proto obsahuje komponenty jako peptidoglykan, polysacharidy, proteiny a teichové kyseliny. Lineární řetězce polysacharidu peptidoglykanu jsou navzájem propojeny pomocí tetrapeptidových můstků. Složení aminokyselin v tetrapeptidech mureinu vykazuje odlišnosti i na kmenové úrovni. Nejčastěji jsou tetrapeptidy složeny z L-alaninu, D-alaninu a kyseliny D-glutamové a L-ornithinu, který může být v některých případech nahrazen lysinem (Biavati et al., 2000).

Buněčná stěna obsahuje také polysacharidy složené nejčastěji z glukosy, rhamnosy a galaktosy, jejich množství i variabilita se u různých druhů bifidobakterií liší – těchto vlastností proto může být využito pro jejich kmenovou identifikaci či charakterizaci (Veerkamp et al., 1965).

Bakterie z čeledi *Bifidobacteriaceae* byly nalezeny v různých ekologických nikách: v trávicím traktu kojenců (např. *B. breve*, *B. infantis*), v TT dospělých lidí (např. *B. adolescentis*), v TT savců (např. *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. boum*, *B. cuniculi*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. saeculare*, *B. thermophilum*), v TT ptáků (např. *B. gallinarium*, *B. pullorum*), v TT hmyzu (např. *B. bohemicum*, *B. actinocoloniiforme*, *B. bombi*, *B. indicum*), v ženské vagíně (*Gardanerella vaginalis*), v odpadních vodách (např. *B. subtile*), v klinických vzorcích (např. *Alloscardovia omnicoles*) či v potravinách (např. *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. crudilactis*). Hlavním místem výskytu této čeledi je trávicí trakt (Simpson et al., 2003; Killer, 2008).

Rod *Bifidobacterium* bývá dělen do 5 skupin, označovaných podle nejdříve objeveného druhu skupiny: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. pullorum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. pseudolongum* (Felis a Dellaglio, 2007; Russell et al., 2011).

V trávicím traktu prasat byly nalezeny například tyto druhy rodu *Bifidobacterium*: *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. longum* subsp. *suis*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. pullorum*, *B. thermophilum* subsp. *porcinum* (Biavati et al., 2000), *B. psychraerophilum* (Simpson et al., 2004a), *B. thermacidophilum* subsp. *porcinum*, *B. thermacidophilum* subsp. *thermacidophilum* (Zhu et al., 2003). Z rodu *Aeriscardovia* byl nalezen v tenkém střeve prasete druh *A. aeriphila* (Simpson et al., 2004a). V nedávné době byly izolovány z trávicího traktu divokého prasete 2 druhy rodu *Pseudocardovia*: *P. suis* a *P. radai* (Killer et al., 2013; Killer et al., 2014). Uvedené druhy rodu *Bifidobacterium* (kromě samostatně stojícího druhu *B. longum*) spadají do 3 výše citovaných skupin (a jsou ve výčtech dalších druhů těchto skupin zvýrazněny tučně):

- skupina ***Bifidobacterium pullorum*** – ***B. pullorum***, *B. gallinarum*, *B. saeculare*
- skupina ***B. boum*** – ***B. boum***, ***B. thermacidophilum***, ***B. thermophilum***
- skupina ***B. pseudolongum*** – ***B. pseudolongum***, ***B. animalis***, ***B. choerinum***, ***B. cuniculi***, ***B. gallicum*** (Felis a Dellaglio, 2007; Russell et al., 2011)

Bifidobakterie jsou řazeny do skupiny sacharolytických mikroorganismů s heterofermentativním způsobem utilizace glukosy i ostatních hexos. Od ostatních heterofermentativních bakterií mléčného kvašení se liší absencí enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a aldolasy, disponují ale naopak zmiňovaným, pro čeleď charakteristickým, enzymem fruktosa-6-fosfát fosfoketolasou. Bifidobakterie vytvářejí fermentací sacharidů kyselinu octovou a mléčnou v ideálním molárním poměru 3 : 2, jako konečný produkt fermentace sacharidů (Scardovi et al., 1965). Při tomto energetickém procesu vzniká ze 2 molekul glukosy 5 molekul ATP. Výsledný poměr konečných produktů se může u různých druhů bifidobakterií lišit (De Vries et al., 1968). U některých kmenů bifidobakterií byla zjištěna malá produkce kyseliny jantarové, (Scardovi, 1986) a za výjimečných podmínek (např. při vysoké koncentraci kultivačního média) také produkce kyseliny propionové a máselné (Han et al., 2005).

Glukosu využívají všechny druhy bifidobakterií, kromě některých druhů izolovaných ze slepých střev drůbeže (Rada a Petr, 2000), dále všechny druhy bifidobakterií fermentují fruktosu (např. kromě *B. cuniculi* a *B. choerium*), sacharosu (kromě některých kmenů *B. bifidum*), maltosu (neutilizuje *B. bifidum* a některé kmeny *B. asteroides* a *B. indicum*), galaktosu (neutilizuje *B. minimum* a některé kmeny *B. asteroides* a *indicum*), rafinosu (neutilizuje *B. bifidum*, *B. cuniculi*, *B. gallicum* a *minimum*) a melibiosu (neutilizuje *B. minimum*, *B. bifidum*). Udává se, že jednotlivé druhy bifidobakterií se od sebe odlišují specifickou fermentací laktosy a melecitosy. Melecitosu využívají pouze druhy *B. longum*, *B. substile* a *B. adolescentis*, laktosu využívají všechny lidské a většina savčích druhů bifidobakterií (Scardovi, 1986; Sgorbati et al., 1995).

Většina kmenů je schopna využívat amonné soli, jako jediný zdroj dusíku (Hassinen et al., 1951), pro kmeny animálního původu *B. suis*, *B. magnum*, *B. cuniculi* a *B. choerium* se udává, že rostou pouze v přítomnosti organického dusíku (Ballongue, 2004). Velké množství bifidobakterií nemá dostatečně účinný proteolytický aparát. Jsou schopné využívat organický dusík v podobě aminokyseliny tryptofanu (Aragozzini et al., 1979) a většina kmenů bifidobakterií (kromě *B. cuniculi*) má ureázovou aktivitu, která jim umožňuje využívat močovinu, jako zdroj dusíku (Crociani a Matteuzzi, 1982).

3.4 Izolace a kultivace laktobacilů a bifidobakterií z TT prasat

3.4.1 Izolace a kultivace laktobacilů

Optimální teplota růstu laktobacilů se nachází v intervalu mezi 30 – 40 °C. Optimální pH pro jejich kultivaci bývá 5,5 – 6,2 či nižší. Zásadité pH zpomaluje jejich růst (Beijerinck, 1901).

Pro izolaci a kultivaci laktobacilů je potřeba brát v úvahu jejich komplexní nutriční požadavky, jejich acidotolerantní či acidofilní povahu a preferenci mikroaerofilních podmínek. Pro laktobacily je využíván jako základní kultivační médium neselektivní MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar, jehož hlavními složkami jsou pepton, kvasničný extrakt (vitamíny, aminokyseliny), hovězí extrakt, minerální látky (Na, Mg), jako zdroj uhlíku je zde obsažena glukosa (De Man et al. 1960). Pro izolaci laktobacilů z komplexní populace je však

nutné užít selektivních médií. Zde je možné využít kyselého Rogosa agaru, ve kterém je glukosa nahrazena maltosou, fruktosou, sacharasou či arabinosou. Toto médium se také modifikuje přidáním cyklohexamidu (100 ml/l). Pro izolaci střevních laktobacilů lze využít také modifikované MRS, SL nebo LAMVAB (MRS médium s přidáním vancomycinu, cysteinu a pH 5,0 (Hartemink et al., 1997).

3.4.2 *Izolace a kultivace bifidobakterií*

Optimální teplota růstu u lidských druhů bifidobakterií se pohybuje od 36 – 38 °C, u animálních druhů se teplota růstu pohybuje v intervalu od 41 °C do 43 °C (Ventura et al., 2004). Bifidobakteriím vyhovuje pH růstu v rozmezí 6,5 až 7, pH pod 3,5 či vyšší než 8 inhibuje jejich růst (Scardovi, 1986; Delgado et al., 2008).

Pro izolaci a kultivaci bifidobakterií byly v minulosti využívány různé druhy médií, v současné době se užívá jako základní médium TPY (Tryptone Phytone Yeast extract) agar a jeho modifikace (Scardovi, 1986). Hlavními složkami tohoto média jsou trypton, pepton a kvasničný extrakt a jako základní zdroj uhlíku, je zde obsažena glukosa. Složení tohoto média je optimální pro růst všech druhů bifidobakterií.

Pro izolaci bifidobakterií z přírodních, směsných vzorků bylo nutné média modifikovat, aby byla zajištěna jejich selektivní účinnost. Využívá se odolnosti bifidobakterií vůči různým druhům antibiotik či jejich nároků na pH prostředí. Různí autoři zkoumali selektivní média pro izolaci bifidobakterií z různých zdrojů. Lim et al. (1994) použili BGL médium s obsahem glukózy a jaterního extraktu s přidáním gentamicinu (30 µg/ml) pro zjištění počtu bifidobakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích. Hatemik et al. (1996) použili selektivní RB médium s obsahem rafinosy a přidáním kyseliny propionové a chloridu litného, jako selektivních faktorů, pro izolaci bifidobakterií ze směsných vzorků. Rada et al. (1999) navrhli modifikovaný Wilkins-Chalgren (MW) agar s přidáním antibiotika mupirocinu (100 mg/l) a ledové kyseliny octové (1 ml/l) jako selektivních faktorů pro izolaci bifidobakterií z fekálních vzorků drůbeže a králíků. Nejčastěji používaným selektivním médiem pro izolaci bifidobakterií v poslední době je modifikovaný TPY agar (MTPY) s přidáním mupirocinu a kyseliny octové ve stejném množství, jako u MW agaru. MTPY médium oproti výše uvedeným prokázalo nejvyšší selekční efekt. Toto médium bylo poprvé testováno u vzorků ze slepých střev nosnic (Rada a Petr, 2000). Modifikované TPY médium, pouze s přidáním mupirocinu, je možné využít při kultivaci a izolaci bifidobakterií z kysaných mléčných výrobků. Selektivní účinek mupirocinu využili také Simpson et al.

(2004b) k modifikaci MRS agaru. Autoři Killer et al. (2013) rovněž využili MTPY agar pro obtížnou izolaci bifidobakterií z tenkého a tlustého střeva prasete divokého. Vzorky očkované na selektivní půdy pro izolaci bifidobakterií, se v Petriho miskách kultivují za teploty 37 – 39 °C, 48 h v anaerostatu s vyvíječem anaerobní atmosféry (Goodfellow et al., 2012).

3.5 Identifikace laktobacilů a bifidobakterií z TT prasat

3.5.1 Identifikace laktobacilů a bifidobakterií

Správná identifikace bakterií na úrovni rodové, druhové či kmenové je základním předpokladem pro jejich další využití (probiotika, potravinářské kultury atd.) a charakterizaci (Felis a Dellaglio, 2007). V mikrobiologických prvopočátcích byla zkoumána výhradně morfologie buněk, kolonií či jejich kultivační vlastnosti. Časem se začaly vyvíjet biochemické a enzymové metody a testy, které spolu s výše jmenovanými vlastnostmi, identifikují bakterie na základě jejich fenotypických vlastností – těchto vlastností se v současné době využívá převážně v procesu charakterizace. Identifikace bakterií na základě jejich fenotypických vlastností často vedla k nejednoznačným výsledkům, hledaly se proto nové metody (Ventura et al., 2004). Jak bylo zmíněno v oddílu 3.3.3.2 metabolismus bifidobakterií, bifidobakterie disponují charakteristickým enzymem F6PPK, který se i v dnešní době užívá pro identifikaci čeledi *Bifidobacteriaceae*. Aktivita tohoto enzymu byla ale také již detekována u „divokých“ kmenů *Lactobacillus reuteri*, které byly izolovány z TT prasat. Tyto izoláty ale nebyly kultivovány za standardních optimálních podmínek (extrémně snížené pH). K identifikaci bakterií je proto nezbytné přistupovat polyfázicky, za současného využití různých metod či přístupů (Årsköld et al., 2008; Bolado-Martínez, et al., 2012). Rozvoj biologie, biochemie, genetiky a IT technologií umožnil vznik nových molekulárně-genetických metod, které jsou v dnešní době hojně využívány k identifikaci bakterií. Tyto metody se zdají být obecně přesnější než metody založené na fenotypických vlastnostech bakterií (Temmerman et al., 2003).

Identifikační metody založené na molekulárně-genetických vlastnostech, vycházejí ze studia DNA. K identifikaci bakterií se využívají metody založené na analýze 16S rRNA (Jian

et al., 2001). Fylogenetický gen kódující 16S rRNA obsahuje shodné sekvence, které jsou společné pro všechny prokaryotní bakterie, ale také obsahuje sekvence, které jsou specifické pro určité druhy či skupiny bakterií. Geny pro 16S rRNA a 16S rDNA (= části ribozomální DNA) představují vhodné markery k fylogenetické analýze při studiu bakteriální diverzity (Van der Meulen et al., 2006).

3.5.2 Molekulárně-genetické metody

3.5.2.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Molekulárně-genetická metoda PCR má všestranné využití – lze ji použít také k identifikaci bakterií, laktobacily a bifidobakterie nevyjímaje. Jedná se o rychlou, citlivou a relativně nepřiliš náročnou metodu (Matsuki et al., 2002). Základem PCR je amplifikace, tedy selektivní namnožení vybraných oblastí DNA (použitím Taq-DNA polymerasy), přičemž dva rodově či druhově specifické primery (oligonukleotidy) určují lokalizaci a velikost amplifikovaného úseku. Elementárním principem PCR je opakovaná asistovaná denaturace dvojitě vázané DNA a následná renaturace jejích osamocených vláken pomocí specifických oligonukleotidů, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následovně jako primery pro syntézu nového vlákna DNA. Proces amplifikace DNA probíhá ve 3 po sobě se opakujících krocích:

1. Denaturace (teplota v rozmezí 94 – 96 °C)
2. Hybridizace primerů (teplota v rozmezí 40 – 72 °C)
3. Syntéza nového vlákna DNA (teplota 72 °C)

V první fázi cyklu dochází k zahřátí PCR reakční směsi na teplotu 94 – 96 °C (u silně stabilních polymeráz může být použita teplota 98 °C) po dobu 5 – 10 minut. Tyto faktory způsobí rozpad vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi. Z jednoho dvojitě vázaného řetězce DNA tak vzniknou dva jednovláknové řetězce DNA. Po denuraci následuje druhý krok, kde snížení teploty (20 – 40 sekund) má za následek navázání oligonukleotidových primerů na specifická místa DNA (na principu doplňkovosti bází). Navázané primery tak ohraničují místa syntézy nových vláken. Následuje třetí krok, kde zvýšení teploty aktivuje DNA polymerasy, které syntetizují nové komplementární řetězce

DNA. Tato fáze trvá v rozmezí 5 – 15 minut, v závislosti na velikosti DNA. Všechny tři kroky se cyklicky opakují (obvykle 20 – 35 cyklů). K tomuto účelu slouží termocykler, přístroj, kde je možné nastavit teplotu, délku a počet cyklů. Produkty PCR reakce jsou nejčastěji separovány pomocí elektroforetické separace v agarosovém či polyakrylamidovém gelu. Při elektroforetické separaci dojde k rozdělení DNA fragmentů v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. Velikost PCR fragmentů se následně porovnává se standardem o známé velikosti, který je na gel nanášen současně (Satokari, et al., 2001; Ward a Roy, 2005).

3.5.2.2 Restrikční analýza amplifikované rDNA (ARDRA)

Tato metoda je založena na amplifikaci DNA z úseku 16S rDNA, produkty PCR jsou následně štěpeny vhodnými restrikčními enzymy na sekvenčně specifické fragmenty. Někteří autoři využili kromě sekvence 16S rDNA genu, také jiné konzervativní sekvence, např. gen *ldh*, který kóduje L-laktát dehydrogenasu, či gen *recA* (kóduje rekombinační enzym), který se vyskytuje u bakterií všeobecně. Vyhodnocení této metody se provádí za užití počítačových programů, např. BioNumerics (Roy a Sirois, 2000; Moreira et al., 2005).

Ventura et al. (2000) použil tuto metodu k druhové identifikaci lactobacilů pocházejících z fekálních vzorků, které předcházela rodově specifická PCR. Španová a kol., (2005) použila tuto metodu pro druhovou identifikaci bifidobakterií a lactobacilů z fekálních vzorků kojenců.

3.5.2.3 Denaturační/teplotní gradientová elektroforéza (DGGE/TGGE)

Základním principem těchto metod je oddělení individuálních rRNA genů na základě rozdílné chemické stability či teploty tání těchto genů. U DGGE gelu je hlavní složkou formamid a močovina, které vytvářejí lineární denaturační gradient. U TGGE je využíváno teplotního gradientu. Separace stejně dlouhých DNA fragmentů je umožněno denaturačním bodem. DNA je denaturována v místech AT párů bází ochotněji než v místech CG párů bází, které jsou mnohem odolnější. Stupeň denaturace se tedy odvíjí od nukleotidové sekvence daného fragmentu. Pro zviditelnění ssDNA se při PCR amplifikaci přidávají primery s CG-svorkou, které posléze ohraničují jeden konec vzniklé dvoušroubovice (Křížová a kol., 2006). Metoda TGGE se odlišuje tím, že denaturace DNA je způsobena teplotou, místo denaturačním činidlem, jako u DGGE metody. Při použití skupinově, rodově či druhově specifických primerů při amplifikaci, lze touto metodou také identifikovat bakterie.

Satokari et al. (2003) použil metodu DGGE pro identifikaci bifidobakterií a laktobacilů z lidského TT. Peterson et al. (2009) použil metodu DGGE pro monitoring bifidobakterií a laktobacilů z TT prasat.

3.5.2.4 Sekvence genomu

Sekvence DNA je proces, který vede k určení pořadí nukleotidů ve specifické molekule DNA. Pro přímou fylogenetickou identifikaci se používá metoda přímého sekvenování ampliconů 16S rDNA. V dnešní době se užívají automatické sekvenátory založené na principu Sangerova sekvenování. U automatického sekvenování probíhá syntéza DNA v jedné reakci pomocí asymetrické PCR, ke značení produktu jsou užity dideoxyribonukleotidy, které jsou označeny 4 různými fluorescenčními značkami. Detekce produktů probíhá při elektroforéze pomocí laserového detektoru připojeného k počítači, který vyhodnotí sekvence (Massi et al., 2004; Sakata et al., 2006).

Pro z efektivnější rychlosti sekvenace byly vytvořeny tzv. metody nové generace (NGS – Next Generation Sequencing), které vycházejí z masivně paralelního sekvenování, kdy pro oddělení jednotlivých fragmentů je např. užita emulzní PCR (em-PCR), kde dochází k vytvoření tzv. mikroreaktorů, které obsahují všechny potřebné komponenty pro PCR (primery, polymerasy, nukleotidy). Na mikrokuličky v mikroreaktoru dochází k navázání fragmentu DNA a následně pomocí klonální amplifikace dochází k namnožení templátové DNA v mikroreaktoru. Každý mikroreaktor má svou specifickou značku, přístroj tedy rozezná jeho původ. Pro vlastní sekvenaci je podobně, jako u Sangerovy metody využívána různá světelná emise, při ligaci nového vlákna DNA. V každém mikroreaktoru dojde k ligaci každého klonálního vlákna DNA, které přístroj zachytí a počítač pak zpětně může porovnat zachycené sekvence a statisticky opravit chyby. Během jednoho experimentu může být získáno až 1 000 000 sekvencí. NGS metody jsou rychlé a lze jimi analyzovat více různých vzorků ve stejnou dobu. Všechny odvozené technologie jako je 454-pyrosekvenace, Solexa, aj. využívají principu masivně paralelního sekvenování, liší se v použití různých chemikálií (Sim et al., 2012; Pajarillo et al., 2014). Pajarillo et al., (2014) použil metodu 454-pyrosekvenace pro rodovou identifikaci zastoupení bakterií v mikrobiomu 3 plemen domácích prasat, – včetně rodů *Lactobacillus* a *Bififobacterium*.

3.5.2.5 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/MS

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací spolu s matricí (MALDI MS) získala svou oblibu kvůli rychlosti provedení celé analýzy a schopnosti rozlišení bakteriálních vzorků na požadovanou úroveň (rod, druh).

Před vlastní analýzou je nutné nanést biologický vzorek na kovovou destičku, která je po následném vysušení (krystalizaci), vložena do přístroje, kde je na krystaly matrice se vzorkem vyzařováno laserové záření, které vyvolá desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku. Extrahované nabitě molekuly jsou analyzované v průletovém hmotnostním analyzátoru (TOF). Průletový hmotnostní analyzátor změří dobu, kterou ion potřebuje k překonání cesty mezi detektorem a zdrojem iontového záření, tzv. dobu letu. Výsledné hmotnostní spektrum je porovnáváno s knihovnou hmotnostních spekter pomocí program MALDI Biotyper, který identifikuje vzorek.

Analýze předchází samotná kultivace bakterií, která tento proces zpomaluje, tento krok je ale nutný u většiny identifikačních metod (Huonga et al., 2014).

Strompfová a Lauková (2014) použili tuto metodu pro identifikaci laktobacilů a bifidobakterií z fekálních vzorků psů a primátů.

3.6 Charakterizace laktobacilů a bifidobakterií

Charakterizace je proces, který zjišťuje odlišnosti bakterií na úrovni mezidruhové či mezikmenové. Metody charakterizace vycházejí z fenotypických a genotypických odlišností bakterií. Pro fenotypické analýzy jsou využívány biochemické a enzymatické testy. Ty jsou založeny na sledování metabolismu bakterií, tedy na jejich schopnosti fermentovat různé substráty, dále na přítomnosti různých specifických enzymů či studiu zastoupení AMK v peptidoglykanu. Do genotypických metod charakterizace, které jsou založeny na rozdílnosti DNA v rámci druhů či kmenů bakterií lze zahrnout např. pulzní gelovou elektroforézu, interrepetitivní řetězovou reakci, náhodně amplifikovanou polymorfni DNA a další (Španová a kol., 2005; Lee et al., 2009).

3.6.1 Fenotypické metody

3.6.1.1 Biochemické a enzymatické testy

Biochemické a enzymatické testy slouží k zjištění fyziologické aktivity bakterií a k jejímu výslednému porovnání v rámci druhu či kmene. K tomuto účelu se pro laktobacily a bifidobakterie užívají například API 50 CH, API ZYM, Rapid ID 32 A soupravy (BioMérieux, Francie). Pro práci s těmito soupravami testů je nutné izolovat čisté kultury (Robinson et al., 1981; Rada et al., 2000).

- **API 50 CHL**

Tato souprava obsahuje v 5 stripech 50 jamek, které obsahují 49 různých substrátů. Testuje se zde schopnost bakterií fermentovat různé substráty (např. L-xyloza, laktosa, manitol), což se projeví změnou indikátorové barvy obsažené v médiu v jednotlivých jamkách. Získaný fermentační profil lze srovnat s fermentačním profilem ostatních kmenů či druhů bifidobakterií a laktobacilů izolovaných z různých zdrojů. Killer et al. (2014) například použil tento test k charakterizaci *Pseudoscardovia suis* z TT divokých prasat, Lee et al. (2008) jej použil pro charakterizaci laktobacilů izolovaných z TT kuřat.

- **API ZYM**

Tato souprava testů je užívána pro analýzu a porovnání enzymatické aktivity různých kmenů bakterií. Tato souprava obsahuje 19 jamek (+1 kontrolní) s odlišnými substráty pro zjištění aktivity různých enzymů (např. trypsinu, esterasy, lipasy, β -glukuronidasy). Aktivita daného enzymu se projeví změnou indikátorové barvy, podobně jako u předchozí soupravy. Konečným výsledkem je obdobně charakteristický enzymatický profil testovaného kmene. Lee et al. (2009) použili tento test k enzymové charakterizaci izolátů *Lactobacillus reuteri* z TT prasat, Kim et al. (2010) využili tento test při charakterizaci *Bifidobacterium stercoris* izolovaného z lidských fekálních vzorků.

- **Rapid ID 32 A**

Souprava se skládá z 31 jamek (+1 kontrolní), které, jako u předchozích typů souprav, obsahují různý substrát pro zjištění přítomnosti konkrétního spektra testovaných enzymů u testovaného kmene. Zjišťuje se přítomnost např.: ureasy, indolu, α -galaktosidasy. Konečným výsledkem je opět enzymatický profil daného kmene. Silvi et al. (2003) použili tento test pro charakterizaci bifidobakterií a laktobacilů izolovaných z lidských fekálních vzorků.

3.6.1.2 Složení buněčné stěny

Pro charakterizaci druhů a kmenů bakterií se také využívá chemická analýza peptidoglykanu obsaženého v jejich buněčných stěnách. Sleduje se zastoupení AMK navázaných na muramovou kyselinu, které je charakteristické pro druhovou i kmenovou úroveň studovaných bakterií.

Další složkou buněčné bakteriální stěny, která se využívá pro jejich charakterizaci, jsou polární lipidy. Killer et al. (2014) např. použil zastoupení AMK a polárních lipidů k charakterizaci nově izolované bifidobakterie z TT divokých prasat. Roos et al. (2000) využil zastoupení AMK v peptidoglykanu při charakterizaci kmenů laktobacilů izolovaných z TT prasete.

3.6.2 Genotypické metody

- **Náhodná polymerázová řetězová reakce (RAPD)**

Tato modifikovaná PCR metoda je rychlou a spolehlivou metodou pro vnitrodruhovou i mezidruhovou diferenciaci mnoha bakteriálních druhů (Rosselló-Mora a Amann, 2001). Při této metodě je použit celý bakteriální genom. U této modifikované PCR metody je vyextrahovaná DNA amplifikována v náhodných místech, kde došlo k přichycení primerů. Pro tuto metodu se užívají krátké primery (11 – 12 nukleotidů). Výsledkem PCR je soubor fragmentů, který specificky odráží sekvenci DNA. Fragmenty různé velikosti jsou pomocí agarosové gelové elektroforézy rozděleny a poté vizualizovány. Počet a velikost DNA fragmentů poukazuje na rozdíly ve stavbě DNA. Metoda je výhodná např. tím, že není nutná znalost DNA sekvence amplifikovaného fragmentu (Rossetti a Giraffa, 2005). Křížová a kol. (2008) použila tuto metodu pro charakterizaci bifidobakterií z mléčných výrobků a jejich porovnání s lidskými druhy.

- **Interrepetitivní polymerázová řetězová reakce (REP-PCR)**

Tato metoda využívá primerů, které se váží na opakující se sekvence uvnitř genomu. K nejčastěji užívaným primerům pro prokaryota jsou: ERIC, REP, BOX a (GTG)_n. Finálním produktem amplifikace je větší množství odlišně velkých amplikonů. Jednotlivé kmeny se odlišují přítomností opakujících se elementů a jejich lokalizací, výsledkem je jedinečný fingerprintový profil (Křížová a kol., 2006). Vyhodnocení vzájemné podobnosti takových profilů bývá provedeno pomocí počítačových programů, které jsou schopny sestavit dendrogram vzájemných vztahů mezi analyzovanými kmeny. Využití (GTG)₅ primeru umožňuje rozlišení některých kmenů laktobacilů (Gevers et al, 2001). Křížová, (2008) použila kombinaci (GTG)₅ a BOXA1R primerů pro charakterizaci kmenů bifidobakterií izolovaných z mléčných výrobků a referenčních kmenů.

- **Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)**

Metoda je založena na použití elektrického pulzního systému k separaci velmi dlouhých fragmentů DNA na agarosovém gelu. Při PFGE se periodicky mění orientace elektrického pole. Molekuly DNA se při působení elektrického pole prodlužují a zarovnávají ve směru elektrického pole a pohybují se směrem k anodě. Po odstranění elektrického pole se

prodloužená molekula DNA vrací nazpět do svého ideálního stabilního stavu. Doba setrvání v tomto stabilním stavu je závislá na délce molekuly DNA. Periodické změny elektrického pole způsobí přechod DNA z ideálního stabilního stavu do opětovného prodlužování a zarovnávání molekul podle orientace nového pole. Při aktivaci prvního elektrického pole se separované molekuly DNA orientují po směru proudu a začnou se pohybovat gelem. Posléze se toto působení přeruší a zapojí se druhé elektrické pole, které nutí molekuly DNA změnit směr svého pohybu. To má za následek změnu orientace molekuly DNA. Molekulám DNA o vyšší molekulové hmotnosti trvá delší dobu změna jejich orientace než molekulám DNA o nižší molekulové hmotnosti, proto je jejich pohyb pomalejší, – čas potřebný k reorientaci molekul DNA stoupá s délkou jejich řetězce. Fragменты DNA jsou tedy pulzní elektroforézou separovány na základě své molekulové hmotnosti. Metodu lze užít k odlišení kmenů bakterií. Její nevýhodou může být potřeba extrakce celé chromozomální DNA zkoumaného mikroorganismu (Cai et al., 2007).

Prasad et al., (1998) použil tuto metodu k charakterizaci kmenů bifidobakterií a laktobacilů pro zjištění jejich probiotického potenciálu. Cai et al. (2007) pomocí této metody charakterizoval kmeny laktobacilů z různých ekosystémů.

- **Multiplexní PCR**

Multiplexní PCR je další modifikací PCR. Do jedné reakce se přidává více dvojic primerů s podobnou teplotou hybridizace, to umožní amplifikaci více úseků v jedné PCR reakci. Prostřednictvím většího množství primerů, je vyšší pravděpodobnost vzniku různých nescifických fragmentů. Hlavní podmínkou je, aby vzniklé produkty měly dostatečně odlišnou velikost, aby došlo k jejich úspěšné separaci pomocí elektroforézy. Mullié et al. (2003) použil tuto metodu k odlišení druhů bifidobakterií animálního a lidského původu. Song et al., 2000 užil multiplexní PCR pro porovnání referenčních kmenů laktobacilů s kmeny laktobacilů izolovaných z lidské stolice.

4 Závěr

Dostupné literární zdroje poukazují na rozdílnost bakteriální diverzity mikrobioty či mikrobiomu TT divokého prasete a jeho domestikované formy. S tím korelují i jiné práce zabývající se studiem diverzity mikrobiomu dalších zástupců divokých a domestikovaných zvířat a případně ostatních živočichů. Studium diverzity mikrobioty u člověka taktéž poukazuje na vyšší (a odlišné) druhové spektrum bakterií u příslušníka primitivního kmene, v porovnání s člověkem urbanizovaným.

Zdá se, že spektrum a abundance bifidobakterií a laktobacilů v TT prasat, jsou výrazně ovlivněny výživou jejich hostitele – naznačují to změny počtů bifidobakterií a laktobacilů u divokých prasat chovaných v zajetí, jistě však v návaznosti na kvalitu životního prostředí hostitele.

V práci byly současně shrnuty obecně užívané metody vhodné pro charakterizaci bifidobakterií a laktobacilů izolovaných z TT prasat, byla zmíněna problematika kultivačních médií a identifikace bakterií. V rámci diplomové práce by bylo prospěšné tuto práci rozšířit také o přímý výzkum vlastností kmenů bifidobakterií a laktobacilů izolovaných z TT divokých a domácích prasat.

5 Citovaná literatura

- Aragozzini, F., Ferrari, A., Pacini, N., Gualandris, R. 1979.** Indole-3-lactic acid as a tryptophan metabolite produced by *Bifidobacterium* spp. *Appl Env Microbiol.* 1979, 38, stránky 544-546.
- Årsköld, E., Lohmeier-Vogel, E., Cao, R., Roos, S., Rådström, P., van Niel, E. W. 2008.** Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *Journal of bacteriology.* 2008, Sv. 190, 1, stránky 206-212.
- Bacanu, G. M., Oprea, L. 2014.** Differences in the gut microbiota between wild and domestic *Acipenser ruthenus* evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Romanian Biotechnology Letter.* 2014, 18, stránky 8069-8076.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., Gordon, J. I. 2004.** The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101, stránky 15718-15723.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnberg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. 2005.** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005, 307, stránky 1915-1920.
- Ballongue. 2004.** *Bifidobacteria and probiotic action.* In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects.* New York : Marcel Dekker, 2004. stránky 67-123.
- Beijerinck, M. W. 1901.** Sur les ferments lactiques de l'industrie. *Arch. Néer. Sci.* 1901, Sv. 6, stránky 212-243.
- Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J. P. 2006.** Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews.* 2006, Sv. 30, 4, stránky 487-513.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000.** *Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications.* *Annals of microbiology.* 2000, Sv. 50, 2, stránky 117-132.
- Bolado-Martínez, E., Acedo-Félix, E., Peregrino-Uriarte, A. B., Yepiz-Plascencia, G. 2012.** Fructose 6-phosphate phosphoketolase activity in wild-type strains of *Lactobacillus*, isolated from the intestinal tract of pigs. *Applied biochemistry and microbiology.* 2012, Sv. 48, 5, stránky 444-451.
- Cai, H., Rodriguez, B. T., Zhang, W., Broadbent, J. R., Steele, J. L. 2007.** Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology.* 2007, Sv. 153, 8, stránky 2655-2665.
- Caras, A. R. 1999.** *Zvířata, která změnila člověka. Historie prolínání životů zvířat a lidí.* Praha : Rybka, 1999. str. 261. ISBN: 80-86182-25-8.

- Crociani, F., Matteuzzi, D. 1982.** Urease activity in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol.* 1982, 133, stránky 417-423.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe M. E. 1960.** A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 1960, Sv. 23, stránky 130–135.
- De Vries, W. a A.H., Stouthamer. 1968.** Fermentation of glukose, lactose, galaktose, mannitol, and xyose by bifidobacteria. *J bacteriol.* 1968, 96, stránky 472-478.
- Dehnart, J. 1957.** Untersuchungen über die gram positive Stuhlflora des Brust-milchkinder. *Zentrabl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt.* 1957, Sv. I, 169, stránky 66-79.
- Delgado, S., O'sullivan, E., Fitzgerald, G., Mayo, B. 2008.** In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates. *Journal of applied microbiology.* 2008, Sv. 104, 4, stránky 1119-1127.
- Diller, J. 2002.** *Savci, 3, Šelmy, kytovci, sirény, chobotnatci, damani, lichokopytníci, sudokopytníci.* 1. Praha : Knižní klub, 2002. str. 160. ISBN 80-242-0690-0.
- Evin, A., Cucchi, T., Dobney, K., et al. 2016.** Using traditional biometrical data to distinguish West Palearctic wild boar and domestic pigs in the archaeological record: new methods and standards. *Journal Of Archaeological Science.* 2016, Sv. 43, stránky 1-8.
- Falsen, E., Pascual, C., Sjoden, B., Ohlen, M., Collins, M. D. 1999.** Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, Sv. 49, stránky 217–221.
- Felis, G. E., Dellaglio, F. 2007.** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology.* 2007, 8, stránky 44-61.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G. 2004.** *Taxonomic Outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Sytematic Bacteriology.* 2 nd edition. New York : Springer-Verlag, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>.
- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.** <https://www.dsmz.de>. [Online] [Citace: 15. 1 2016.] <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. 2001.** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters.* 2001, Sv. 205, 1, stránky 31-36.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. 2012.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria, part A.* 2. vydání. New York : Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 978-0-387-95043-3.

- Haakensen, M. C., Pittet, V. P., Ziola, B. 2011.** Reclassification of *Paralactobacillus selangorensis* (Leisner et al., 2000) as *Lactobacillus selangorensis* comb. nov. *In J Syst Evol Microbiol.* 61, 2011, stránky 2979–2983.
- Hammes, W. P., Hertel, C. 2009.** Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901. [editor] P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W. De Vos. *Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 3.* 2. ed. Berlin : Springer, 2009, stránky 465–510.
- Han, R.; Ebert, C.; Zhao, Z.; Li, L.; Zhang, H.; Tian, R. 2005.** Novel characteristics of *Bifidobacterium bifidum* in solid state fermentation system. *World J Microbiol and Biotechn.* 2005, 21, stránky 1245-1248.
- Hanslian, A. 1925.** Dějiny vývoje užitkových domácích zvířat. 1. vydání. Praha : Ministerstvo zemědělství R.Č.S., 1925, str. 267.
- Hartemink, R., Domenech, V.R., Rombouts, F.M. 1997.** LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *J. Microbiol. Methods.* 1997, Sv. 29, stránky 77–84.
- Hartemink, R., Kok, B. J., Weenk, G. H., Rombouts, F. M. 1996.** Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods.* 1996, Sv. 27, 1, stránky 33-43.
- Hassinen, J. B., Durbin, G. T., Tomarelli, R. M., Bernhart, F. W. 1951.** The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *J Bacteriol.* 1951, 62, stránky 771-777.
- Hespeler, B. 2007.** Černá zvěř. Praha : Grada Publishing, a.s., 2007. ISBN: 978-80-247-1931-2.
- Hofvendahl, K., Hahn–Hägerdal, B. 2000.** Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources 1. *Enzyme and microbial technology.* 2000, Sv. 26, 2, stránky 87-107.
- Huonga, T. T., Komínková, M., Guráň, R., Ruttkay-Nedecký, B., Kopel, P., Trnková, L., Zítka, O., Adam, V., Kizek, R. 2014.** Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies.* 2014, Sv. 1, stránky 64-66.
- Ishibalshi, N. 1997.** Bifidobacteria: their significance n human intestinal health. *Malaysian Journal of Nutrition.* 1997, Sv. 3, stránky 149-159.
- Jelínek, P., Koudela, K. a kolektiv. 2003.** *Fyziologie hospodářských zvířat.* Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 80-7157-644-1.
- Jensen, O. 1924.** La classification des bacteries lactique. *Le Lait.* 1924, Sv. 4, stránky 468-474.
- Jensen, P., Wright, D. 2014.** Behavioral genetics and animal domestication. [editor] T. Grandin a M. J. Deesing. *Genetics and the behavior of animals.* 2014, stránky 41-80.

- Jian, W., Zhu, L., Dong, X. 2001.** New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001, Sv. 51, 5, stránky 1633-1638.
- Jonsson, E., Conway, P. 1992.** Probiotics for pigs. In: R Fuller (ed) Probiotics – The Scientific Basis. London : Chapman & Hall, 1992. stránky 59-141.
- Killer, J. 2008.** Disertační práce: Enzymové aktivity bifidobakterií v trávicím traktu, izolace a popis nových druhů čeledi *Bifidobacteriaceae*. Praha : Česká zemědělská univerzita, Katedra výživy, mikrobiologie a dietetiky, 2008. str. 161. Školitel: prof. Ing. V. Rada.
- Killer, J., Havlík, J., Bunešová, V., Vlková, E., Benada, O. 2014.** *Pseudoscardovia radai* sp. nov., a representative of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of a wild pig (*Sus scrofa scrofa*). *J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014, Sv. 64, 9, stránky 2932-2938.
- Killer, J., Mrázek, J., Bunešová, J., Havlík, J., Koppová, I., Benada, O., Rada, V. J. Kopečný, E. Vlková. 2013.** *Pseudoscardovia suis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*). *Systematic and Applied Microbiology*. February 2013, Sv. 36, 1, stránky 11-16.
- Kim, M. S., Roh, S. W., Bae, J. W. 2010.** *Bifidobacterium stercoris* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010, Sv. 60, 12, stránky 2823-2827.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*. 1998, Sv. 41, 2, stránky 103-125.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998.** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *J Food Microbiol.* 1998, Sv. 41, 2, stránky 103–125.
- König, H. E., Liebich, H. G. 2002.** *Anatomie domácích savců*. Bratislava : Hajko & Hájková, 2002. ISBN: 80-88700-57-4.
- Křížová, J., Španová, A., Rittich, B. 2006.** Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. *Systematic and applied microbiology*. 2006, Sv. 29, 1, stránky 36-44.
- Křížová, J., Španová, A., Rittich, B. 2008.** RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia microbiologica*. 2008, Sv. 53, 2, stránky 99-104.
- Kwok, L. Y., Zhang, J., Guo, Z., Gesudu, Q., Zheng, Y., Qiao, J., Zhang, H. 2014.** Characterization of fecal microbiota across seven Chinese ethnic groups by quantitative polymerase chain reaction. *PloS one*. 2014, Sv. 9, 4, e93631.

- Larson, G., Albarella, U., Dobney, K. et al. 2007.** Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104, stránky 15276–15281.
- Lee, D. Y., Seo, Y. S., Rayamajhi, N., Kang, M. L., Lee, S. I., Yoo, H. S. 2009.** Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of *Lactobacillus reuteri* from pig feces. *The Journal of Microbiology*. 2009, Sv. 47, 6, stránky 663-672.
- Lee, N. K., Yun, C. W., Kim, S. W., Chang, H. I., Kang, C. W., Paik, H. D. 2008.** Screening of Lactobacilli derived from chicken feces and partial characterization of *Lactobacillus acidophilus* A12 as an animal probiotics. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2008, Sv. 18, 2, stránky 338-342.
- Lega, C., Raia, P., Rook, L., Fulgione, D. 2016.** Size matters: A comparative analysis of pig domestication. *Holocene*. 2016, Sv. 26, 2, stránky 327-332. doi:10.1177/0959683615596842.
- Leisner, J. J., Vancanneyt, M., Goris, J., Christensen, H., Rusul, G. 2000.** Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov.sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *J Syst Evol Microbiol*. 2000, 50, stránky 19–24.
- Lim, K. S., Huh, C. S., Baek, Y. J., Kim, H. U. 1994.** A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*. 1994, Sv. 78, 10, stránky 2108-2112.
- Marvan, F., a kolektiv. 2011.** *Morfologie hospodářských zvířat*. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze, 2011. str. 304 + 24 stran přílohy. 978-80-213-2188-5.
- Massi, M., Vitali, B., Federici, F., Matteuzzi, D., Brigidi, P. 2004.** Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina. *Journal of applied microbiology*. 2004, Sv. 96, 4, stránky 777-786.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R. 2002.** Genus-and Species-specific PCR Primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2002, 4, stránky 61-69.
- Mikkelsen, L.L., Bendixen, C., Jakobsen, M., Jensen, B.B. 2003.** Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Appl. Environ. Microbiol*. 2003, 69, stránky 654-658.
- Moreira, J., Mota, R. M., Horta, M. F., Teixeira, S. M., Neumann, E., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C. 2005.** Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC microbiology*. 2005, Sv. 5, 1, stránky 1-15.
- Mullié, C., Odou, M. F., Singer, E., Romond, M. B., Izard, D. 2003.** Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS microbiology letters*. 2003, Sv. 222, 1, stránky 129-136.

- Orla-Jensen S. 1919.** *The lactic acid bacteria*. Copenhagen : Fred Host and Son, 1919.
- Orla-Jensen, S. 1924.** Classification des bactéries lactiques. *Lait*. 4, 1924, stránky 468-474.
- Owen, J., Dobney, K., Evin, A., Cucchi, T., Larson, G., Strand Vidarsdottir, U. 2014.** The zooarchaeological application of quantifying cranial shape differences in wild boar and domestic pigs (*Sus scrofa*) using 3D geometric morphometrics. *Journal Of Archaeological Science*. 2014, Sv. 43, stránky 159-167.
- Pajarillo, E. A. B., Chae, J. P., Balolong, M. P., Kim, H. B., Seo, K. S., Kang, D. K. 2014.** Pyrosequencing-based analysis of fecal microbial communities in three purebred pig lines. *Journal of Microbiology*. 2014, Sv. 52, 8, stránky 646-651.
- Petersson, A., Domig, K. J., Nagel, P., Zollitsch, W., Hagemüller, W., Kneifel, W. 2009.** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)-based monitoring of intestinal lactobacilli and bifidobacteria of pigs during a feeding trial. *Archives of animal nutrition*. 2009, Sv. 63, 2, stránky 112-126.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P. K. 1998.** Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*. 1998, Sv. 8, 12, stránky 993-1002.
- Rada, V. a Petr, J. 2000.** A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J Microbiol Methods*. 2000, 43, stránky 127-132.
- Rada, V., Marounek, M. 2005.** *Probiotika a prebiotika ve výživě zvířat*. Praha : Výzkumný ústav živočišné výroby, 2005. str. 33.
- Rada, V., Sirotek, K., Petr, J. 1999.** Evaluation of selective media for bifidobacteria in poultry and rabbit caecal samples. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 1999, Sv. 46, 6, stránky 369-373.
- Reece, W.O. 2011.** *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. 2. vydání. Praha : Grada Publishing, 2011. str. 477. ISBN: 978-80-247-3282-4.
- Robinson, I.M., Allison, M.J., Bucklin, J.A. 1981.** Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, stránky 950-955.
- Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., Jonsson, H. 2000.** *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000, Sv. 50, 1, stránky 251-258.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001.** The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*. 2001, Sv. 25, 1, stránky 39-67.
- Rossetti, L., Giraffa, G. 2005.** Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*. 2005, Sv. 63, 2, stránky 135-144.

- Roy, D., Sirois, S. 2000.** Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, Sv. 191, 1, stránky 17-24.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N. 2014.** Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PloS one*. 2014, Sv. 9, 3, e91853.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. 2011.** Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International journal of food microbiology*. 2011, Sv. 149, 1, stránky 88-105.
- Sakata, S., Ryu, C. S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M., Benno, Y. 2006.** Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences. *Microbiology and immunology*. 2006, Sv. 50, 1, stránky 1-10.
- Salanitro, J.P., Blake, I.G., Muirhead, P.A. 1977.** Isolation and identification of fecal. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977, 33, stránky 79-84.
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G. E. 2012.** The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2012, Sv. 4, 4, stránky 217-226.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M., de Vos, W. M. 2001.** Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, Sv. 67, 2, stránky 504-513.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Smidt, H., Saarela, M., Mättö, J., de Vos, W. M. 2003.** Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and applied microbiology*. 2003, Sv. 26, 4, stránky 572-584.
- Scardovi, V. a Trovatelli, L. D. 1965.** the fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol Enzymol*. 1965, 15, stránky 19-29.
- Scardovi, V. 1986.** Genus *Bifidobacterium* In: Bergey's "Manual of systematic Bacteriology". [editor] Williams a Wilkins MD. 1986, stránky 1918-1434.
- Scupham, A. J., Patton, T. G., Bent, E., Bayles, D. O. 2008.** Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. *Microbial Ecology*. 2008, Sv. 56, 2, stránky 322-331.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., Finlay, B. B. 2010.** Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010, Sv. 90, 3, stránky 859-904.
- Sgorbati, B., Biavati, B. a Palenzona, D. 1995.** *The Genus Bifidobacterium*. In: *The Lactic Acid Bacteria (Vol2)*. [editor] B.J. B. Wood a W. H. Holzapfel. místo neznámé : Chapman & Hall, 1995. stránky 279-306. ISBN: 978-1-4613-7666-8 DOI: 10.1007/978-1-4615-5817-0.

- Schleifer, K. H., Kandler O. 1972.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 1972, Sv. 36, stránky 407-477.
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., ... & Fiori, J. 2014.** Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature communications.* 2014, Sv. 5, 3654.
- Silvi, S., Verdenelli, M. C., Orpianesi, C., Cresci, A. 2003.** EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing: isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. *Journal of Food Engineering.* 2003, Sv. 56, 2, stránky 195-200.
- Sim, K., Cox, M. J., Wopereis, H., Martin, R., Knol, J., Li, M. S., Kroll, J. S. 2012.** Improved detection of bifidobacteria with optimised 16S rRNA-gene based pyrosequencing. *PloS one.* 2012, Sv. 7, 3, str. e32543.
- Simpson, P. J., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Ross, R. P. 2004b.** The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of microbiological methods.* 2004, Sv. 57, 1, stránky 9-16.
- Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2004a.** *Bifidobacterium psychraerophilum* sp.nov., and *Aeriscardovia aeriphila* gen. no., sp. nov., isolated from porcine caecum. *International Joournal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2004, Sv. 54, stránky 401-406.
- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. 2003.** Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *Journal of bacteriology.* 2003, Sv. 185, 8, stránky 2571-2581.
- Song, L., Kato, N., Liu, C. X., Matsumiya, Y., Kato, H., Watanabe, K. 2000.** Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group-and species-specific primers derived from the 16S–23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters.* 2000, Sv. 187, 2, stránky 167-173.
- Strompfová, V., Lauková, A. 2014.** Isolation and characterization of faecal bifidobacteria and lactobacilli isolated from dogs and primates. *Anaerobe.* 2014, Sv. 29, stránky 108-112.
- Stupka, R., a kol. 2013.** *Chov zvířat. 2.* Praha : Powerprint, 2013. str. 289. ISBN: 978-80-87415-66-5.
- Španová, A., Rittich, B., Klesnilová, L., Škapová, T. 2005.** Characterisation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in infant faeces samples. *In BioMicroWorld-2005. Badajoz: Formatex Research Center.* 2005, stránky 1084-1084.

- Temmerman, R., Masco, L., Vanhoutte, T., Huys, G., Swings, J. 2003.** Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, Sv. 69, stránky 6380–6385.
- Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Ganzle, M. G., Vogel, R. F. 2003.** In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, Sv. 69, stránky 945–952.
- Tissier, H. 1900.** *Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson.* Paris : G. Carré et C. Naud, 1900.
- Uhr, G. 1995.** The intestinal tract and the Peyer's patch dimensions of wild boars (*Sus scrofa* L., 1758) and domestic pigs (*Sus scrofa f. domestica*). An allometric comparison. *Journal of Mountain Ecology*. 1995, 3, stránky 77-82.
- Ushida, K., Tsuchida, S., Ogura, Y., Toyoda, A., Maruyama, F. 2015.** Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of suidae. *Animal Science Journal*. 27. Srpen 2015, doi: 10.1111/asj.12492, stránky 1740-0929.
- Van der Meulen, R., Adriany, T., Verbrugghe, K., De Vuyst, L. 2006.** Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Applied and environmental microbiology*. 2006, Sv. 72, 8, stránky 5204-5210.
- Veerkamp, J. H., Lambert, R. a Saito, Y. 1965.** The composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*. var *pensylvanicus*. *Arch Biochem Biophys*. 1965, 112, stránky 120-125.
- Ventura, M., Casas, I. A., Morelli, L., Callegari, M. L. 2000.** Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. *Systematic and applied microbiology*. 2000, Sv. 23, 4, stránky 504-509.
- Ventura, M., Elli, M., Reniero, R., Zink, R. 2001.** Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS microbiology ecology*. 2001, Sv. 36, 2-3, stránky 113-121.
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., Zink, R. 2004.** Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2004, Sv. 86, 3, stránky 205-223.
- Ward, P., Roy, D. 2005.** Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait*. 2005, 85, stránky 23-32.
- White, T. J., Madej, R., Persing, D. H. 1992.** The polymerase chain reaction: clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry*. 1992, Sv. 29, stránky 161-196.

- Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., Smith, G. H. 1917.** The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J. Bacteriol.* 1917, 2, stránky 505–566.
- Yang, L., Bian, G., Su, Y., Zhu, W. 2014.** Comparison of Faecal Microbial Community of Lantang, Bama, Erhualian, Meishan, Xiaomeishan, Duroc, Landrace, and Yorkshire Sows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 2014, Sv. 27, 6, stránky 898-906.
- Zhu, L., Li, W. a Dong, X. 2003.** Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 2003, 35, stránky 1619-1623.

6 Seznam použitých zkratek

AMK – aminokyseliny

ATP – adenosintrifosfát

GTG – guanin-tymin-guanin primer

CoA – koenzym A

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HCl – kyselina chlorovodíková

F6PPK – fruktosa-6-fosfát fosfoketolasa

LAMVAB – *Lactobacillus* Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green

MRS – de Man, Rogosa a Sharpe agar

NGS – Next Generation Sequencing

NADH – redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

PCR – polymerázová řetězová reakce

TT – trávicí trakt

RB – Rafinosa-*Bifidobacterium* agar

rDNA – ribozomální DNA

RNA – ribonukleonová kyselina

rRNA – ribozomální RNA

SL – selective lactobacilli rogosa

TPY – médium s tryptonem a kvasničným extraktem