

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Výskyt bifidobakterií v trávicím traktu primátů

Bakalářská práce

Autor práce: Lucie Bittnerová

Obor studia: Speciální chovy (ABPS)

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výskyt bifidobakterií v trávicím traktu primátů" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2019

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za její ochotu, pochopení, věnovaný čas a odborné rady. Také děkuji za pomoc a trpělivost při vytváření bakalářské práce, jelikož to pro mě nebylo vždy jednoduché. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostoru a vytvoření vhodných pracovních podmínek. Děkuji také své rodině, zejména babičce a mamince.

Výskyt bifidobakterií v trávicím traktu primátů

Souhrn

Bifidobacterium sp. je jedním z častých bakteriálních rodů, který se nachází v trávicím traktu zvířat a člověka. Bifidobakterie mají pozitivní vlastnosti pro trávicí trakt, a proto jsou často využívány jako probiotika. Druhy bifidobakterií jsou buď multi-hostitelské, které mohou být detekovány u více druhů hostitelů, anebo jsou hostitelsky specifické a jsou typické pro určitý živočišný druh. Také jejich vlastnosti mohou být druhově či kmenově specifické. V posledních letech bylo popsáno několik nových druhů bifidobakterií především u primátů. Předpokládáme, že prostředí zoologické zahrady by mělo podporovat spíše kolonizaci multi-hostitelskými druhy.

Cílem bakalářské práce byla izolace a analýza druhového zastoupení rodu *Bifidobacterium* v trávicím traktu primátů chovaných v zoologických zahradách. Výsledky byly srovnávány s výskytem u volně žijících primátů. Bifidobakterie byly kvantifikovány a izolovány pomocí kultivačního stanovení z fekálních vzorků primátů. V této práci byly využity vzorky od druhů: kosman zakrslý (*Callithrix pygmaea*), kosman běločelý (*Callithrix geoffroyi*), tamarin vousatý (*Saguinus imperator*), tamarin žltoruký (*Saguinus midas*), šimpanz (*Pan troglodytes*), gibbon zlatolící (*Nomascus gabriellae*), makak lví (*Macaca silenus*), pavián pláštíkový (*Papio hamadryas*), mangabej žltobřichý (*Cercocebus agilis chrysogaster*). K identifikaci získaných izolátů bifidobakterií na rodovou úroveň byla použita metoda detekce enzymu F6PPK (fruktózo-6-fosfát fosfoketolázy). K druhové identifikaci byla následně využita metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) a sekvenace genu 16S rRNA. U 11 z 12 zkoumaných jedinců primátů byla zjištěna přítomnost bifidobakterií. Pomocí sekvenace byly identifikovány druhy *B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum*, *B. adolescentis* a *B. dentium*, které jsou multi-hostitelskými druhy a vyskytují se zejména u člověka, ale i u jiných živočichů. Zde byly izolovány u starosvětských opic a lidoopů. U novosvětských primátů byly izolovány *B. reuteri*, *B. tissieri*, *B. myosotis*, *B. callitrichos*, *B. aesculapii* a *B. ramosum*, které jsou pro ně typické a potvrzuje to jejich specifitu. U makaka lvího se podařilo izolovat bakterii druhu *Parascardovia denticolens*, která stejně jako bifidobakterie náleží do stejné čeledi *Bifidobacteriaceae*.

Klíčová slova: *Bifidobacterium* sp.; primát; kultivace; identifikace; sekvenace 16S rRNA

Occurrence of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of primates

Summary

Bifidobacterium sp. is one of the common bacterial genera, which is located in the digestive tract of animals and humans. Bifidobacteria have positive properties for the digestive tract, therefore they are used as probiotics. Species of bifidobacteria are multi-host that can occur in more species of hosts or they are host-specific and they are typical of one animal species. In addition, their properties may be species-specific or strain-specific. In recent years, several new species of bifidobacteria have been described, primarily in primates. We assume that the zoological environment should support the colonization of multi-host species.

The aim of the bachelor thesis was to isolate and analyze the species representation of the genus *Bifidobacterium* in digestive tract of primates, who are bred in zoos. The results were compared with the occurrence in wild primates. Bifidobacteria were quantified and isolated using cultivation assay from faecal samples of primates. In this bachelor thesis were used samples of the species: pygmy marmoset (*Callithrix pygmaea*), white-headed marmoset (*Callithrix geoffroyi*), emperor tamarin (*Saguinus imperator*), golden-handed tamarin (*Saguinus midas*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), yellow-cheeked gibbon (*Nomascus gabriellae*), lion-tailed macaque (*Macaca silenus*), hamadryas baboon (*Papio hamadryas*), Golden-bellied mangabey (*Cercocebus agilis chrysogaster*). The enzyme detection method F6PPK (fructose-6-phosphate phosphoketolase) was used to identify acquired bifidobacteria isolates at the genus level. Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and 16S rRNA gene sequencing were then used for identification to the species level. Bifidobacteria were detected in 11 of the 12 primate subjects. By sequencing have been identified *B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum*, *B. adolescentis* and *B. dentium*, which are multi-host species and occur mainly in humans but also in other animals. They were isolated in old world monkeys and apes here. In the new world primates were isolated *B. reuteri*, *B. tissieri*, *B. myosotis*, *B. callitrichos*, *B. aesculapii*, and *B. ramosum*, which are typical for them and confirm their specificity. In lion-tailed macaque was isolated species *Parascardovia denticolens*, which like bifidobacteria, belongs into the same family *Bifidobacteriaceae*.

Keywords: *Bifidobacterium* sp.; primate; cultivation; identification; sequencing of 16S rRNA

Obsah

1 Úvod	8
2 Hypotéza	9
3 Cíl práce	10
4 Literární rešerše	11
4.1 Řád Primáti (Primates)	11
4.1.1 Taxonomie řádu Primáti (Primates).....	11
4.1.2 Základní charakteristika.....	11
4.1.3 Historie vývoje.....	12
4.1.4 Morfologie trávicí soustavy a její odlišnosti a zvláštnosti.....	12
4.1.5 Fyziologie trávicí soustavy	15
4.1.6 Dieta.....	16
4.1.7 Mikrobiota trávicího traktu primátů	17
4.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>.....	19
4.2.1 Taxonomie	19
4.2.2 Historie	19
4.2.3 Morfologie	20
4.2.4 Růst (teplota a pH).....	21
4.2.5 Metabolismus.....	22
4.2.6 Ekologie a výskyt	23
4.2.7 Bifidobakterie izolované z trávicího traktu primátů	23
4.2.8 Izolace a kvantifikace bifidobakterií	25
4.2.9 Identifikace bifidobakterií	26
4.2.10 Bifidobakterie jako probiotika	27
4.2.11 Význam bifidobakterií pro hostitele	29
5 Metodická část a materiál	29
5.1 Odběr vzorků.....	29
5.2 Použité vzorky	30
5.3 Použitá média pro detekci bifidobakterií.....	30
5.4 Rozbor	31
5.5 Izolace DNA	32
5.6 MALDI-TOF MS (extrakce pomocí ethanolu a kyseliny mravenčí).....	33
5.7 Test na detekci enzymu F6PPK	33
5.8 Identifikace získaných izolátů bifidobakterií	33
6 Výsledky.....	35
7 Diskuze	41

8 Závěr.....	44
9 Literatura.....	45
10 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Napříč gastrointestinálním traktem (GIT) živočichů včetně člověka nacházíme společenství mikroorganismů, které nazýváme mikrobiota. Jedná se většinou o prospěšné mikroorganismy, které zastávají mnoho funkcí (metabolickou, bariérovou, regulační a další), setkáváme se však i s mikroorganismy, které mohou svému hostiteli škodit. V současné době je mikrobiota trávicího traktu předmětem řady studií a jedná se o velmi zajímavé téma, které má výrazný potenciál.

Složení mikrobioty trávicího traktu se v průběhu života jedince mění a pro každého jedince je odlišné. Faktory jako je stres, věk, druh přijímané potravy a její složení, zdravotní stav a další, ovlivňují složení a aktivitu mikrobioty. Zejména v období mléčné výživy se setkáváme, jak u mikrobioty zvířat, tak člověka se zvýšenou přítomností bakterií rodu *Bifidobacterium*. Tyto bakterie jsou však typické i pro mikrobiotu dospělých jedinců. Poslední výzkumy ukazují na četné zastoupení této bakteriální skupiny v mikrobiotě primátů.

V posledních letech bylo navíc objeveno mnoho nových druhů bifidobakterií u novosvětských primátů. Například v roce 2017 a 2018 byly objeveny druhy *Bifidobacterium callitrichidarum* (Modesto et al. 2017), *B. imperatoris*, *B. margollesii*, *B. parmae* (Lugli et al. 2018), *B. primatium*, *B. scaligerum*, *B. felsineum*, *B. simiarum* (Modesto et al. 2018). Jelikož řád primátů (Primates) obsahuje přes 300 druhů, tak je zde velký potenciál pro popis dalších doposud nepopsaných bifidobakteriálních druhů.

Obsah této práce je zaměřen na výskyt bifidobakterií v trávicím traktu primátů a na jejich izolaci a identifikaci u primátů ze zoologických zahrad. Otázkou však zůstává, zda prostředí zoologických zahrad umožní detekci nepopsaných druhů nebo zda nebudou spíše detekovány druhy multihostitelské díky uzavřenému ekologickému komplexu, rozdílné dietě, veterinárním zásahům, kontaktu s ošetřovateli a dalším opatřením spojených s péčí o zvířata v ZOO.

2 Hypotéza

Bifidobakterie patří mezi nejčastější rody bakterií vyskytující se v trávicím traktu lidí a zvířat, kde napomáhají stabilizovat rovnováhu střevní mikrobioty a příznivě tak ovlivňují zdraví hostitele. Z trávicího traktu volně žijících primátů bylo v posledních letech popsáno mnoho nových druhů bifidobakterií. Je známo, že některé druhy bifidobakterií jsou hostitelsky specifické, zatímco jiné druhy jsou běžné u více různých hostitelů. Kromě toho mnoho fyziologických charakteristik bifidobakterií může být druhově nebo kmenově specifických. Uměle vytvořené prostředí zoologické zahrady je ideální pro přenos hostitelsky nespecifických tedy multi-hostitelských druhů.

Hypotéza: Předpokládáme tedy, že v trávicím traktu primátů držených v zoologických zahradách budou dominovat spíše multi-hostitelské druhy bifidobakterií.

3 Cíl práce

Cílem práce je izolace a analýza druhového zastoupení bifidobakterií v trávicím traktu primátů držených v zoologických zahradách. Výsledky budou porovnány s druhovým zastoupením bifidobakterií u primátů volně žijících.

4 Literární rešerše

4.1 Řád Primáti (Primates)

4.1.1 Taxonomie řádu Primáti (Primates)

Říše: Živočichové (Animalia)

Kmen: Strunatci (Chordata)

Podkmen: Obratlovci (Vertebrata)

Nadtřída: Čtyřnožci (Tetrapoda)

Třída: Savci (Mammalia)

Nadřád: Placentálové (Placentalia)

Řád: Primáti (Primates) – tento řád dále dělíme na dva podřády. Podřád: Poloopice (Strepsirrhini) a Podřád: Vyšší primáti (Haplorrhini).

(Myers et al. 2019). Dostupné z:

<https://animaldiversity.org/accounts/Primates/classification/#Primates>

4.1.2 Základní charakteristika

Řád primáti obsahuje 300 a více druhů. Je třetím nejrozmanitějším řádem savců po hlodavcích (Rodentia) a netopýrech (Chiroptera) (Groves & Napier 2018). Primáti obývají hlavně tropické lesy, a to převážně stromová stanoviště a lesní vegetační komplexy (Myers 2000; Groves & Napier 2018). Některé druhy, včetně člověka, však koruny stromů opustily (Myers 2000). Ačkoliv existují odchylky mezi některými skupinami primátů, sdílí několik anatomických a funkčních znaků, které poukazují na jejich společné předky. Pokud srovnáme tělesnou hmotnost primátů s velikostí jejich mozku, zjistíme, že jejich mozek je v tomto poměru větší než jiných suchozemských savců. Mozek obsahuje rýhu (*Calcarine sulcus*), která je unikátní a mají ji pouze primáti. Tato rýha odděluje první a druhou vizuální oblast na každé straně mozku (Groves & Napier 2018). Primáti mají zkrácené rostrum. Očnice u primátů směřují dopředu a vidění je stereoskopické (Myers 2000).

Na rozdíl od jiných savců, kteří mají drápy či kopyta, mají zpravidla primáti ploché nehty. Charakteristické jsou chápavé končetiny a protistojný palec, který s ostatními prsty vytváří jakési kleště, pomocí kterých mohou primáti uchopit předměty. Primáti mají specializované nervové zakončení (Meissnerova tělíska) v rukou a nohou. Tato zakončení zvyšují citlivost na dotyky. Jiní placentární savci tato speciální nervová zakončení nemají (Groves & Napier 2018). Tyto znaky se pravděpodobně vyvinuly jako adaptace na život ve stromovém patře. Další možností je, že se jedná o primitivní rysy, které byly z těchto důvodů zachovány (Myers 2000). Zuby primátů se liší od jiných placentárních savců. Premoláry a moláry jsou nízké a zaoblené (Groves & Napier 2018).

Žijící primáty rozdělujeme do dvou podřádů na poloopice (Strepsirrhini) a vyšší primáty (Haplorrhini). Poloopice mají vlhký a holý nos, nižší řezáky tvořící „zubní hřeben“, nemají destičku oddělující orbitu od temporální fossy. Na druhém prstu u zadní končetiny má moho druhů z podřádu poloopic jakýsi „čisticí dráp“, který je využíván vrámcí groomingu (čištění

těla a srsti, může být i vzájemná mezi primáty). Jedná se převážně o stromové druhy s mnoha primitivními charakteristikami, ale také některé druhy s extrémními specializacemi. Vyšší primáti mají chlupatý nos, destičku oddělující orbitu od temporální fossy a nemají „zubní hřeben“. Tento podřád zahrnuje mnohem více druhů a ve většině oblastech hrají důležitou ekologickou roli (Myers 2000).

Nejmenší primát je maki Bertheův (*Microcebus berthae*), který váží přibližně 35 gramů a primát s největší hmotností je jistě gorila (*Gorilla gorilla*), která váží 140 až 180 kilogramů (Groves & Napier 2018).

4.1.3 Historie vývoje

Vývoj začíná před více než 55 miliony lety. V období pozdní křídy se rozrostly lesy po celé zeměkouli (před 94 až 64 miliony lety). V té době se do stromů vyšplhal malý savec, který se živil hmyzem. Jeho potomci se však spoléhali na jedlé části rostlin ve stromovém patře, což je změna, která připravila půdu pro vznik řádu primátů. Přirozený výběr silně zvýhodňuje vlastnosti, které zvyšují efektivitu hledání potravy. Rostlinná potrava se stává v průběhu evolučního času stále důležitější a tím výběr postupně vyústil do řady vlastností, které jsou nyní po primáty charakteristické. Většina těchto vlastností usnadňuje pohyb a shánění potravy ve stromech. Přírodní výběr například poskytl ruce, které se hodí pro uchopování štíhlých větví či pro manipulaci s nalezenou potravou. Selektivní tlak také přispěl ke značnému zlepšení vizuálního aparátu (včetně hloubkového vnímání, ostrého a barevného vidění), což umožnilo primátům rychle cestovat ve stromovém patře a snadno rozpoznat zralé plody nebo drobné mladé listy. Tento tlak podporoval zvýšenou flexibilitu chování a schopnost učit se, pamatovat si identitu a umístění jedlých částí rostlin. Výhody při hledání potravy způsobené zlepšením vizuálních a kognitivních schopností vedly k rozvoji neobvykle velkého mozku, který je pro primáty charakteristický již od jejich vzniku. Časem se primáti rozcházeli do různých větví, a to převážně kvůli dietním tlakům (Milton 1993).

Do biologické skupiny známé jako primáti patří také lidé a jsou zařazeni do podskupiny velkých lidoopů, jednou z hlavních skupin na evolučním stromě primátů. Primáti mohou být rozřazeni do tří rozdílných skupin: poloopice, opice a lidoopi. Lidoopy můžeme rozdělit na dvě podskupiny: menší a velcí lidoopi. Mezi lidoopi patří lidé, šimpanz bonobo, šimpanzi, západní a východní gorily, bornejsští a sumaterští orangutani.

Rozdíl mezi lidoopi a opicemi souvisí s jejich vědeckou klasifikací. Lidoopi a opice starého světa (africké a asijské) sdílí společné předky, ale po určité době v evoluční historii, jak již zde bylo řečeno, zaujali místo v samostatných větvích evolučního stromu. Opice Nového světa patří k parvořádu ploskonosí (Platyrrhini), jak je již patrné z názvu, tyto druhy mají plochý nos, zatímco lidoopi a opice starého světa se řadí k parvořádu úzkonosí (Catarrhini), kteří mají hákovitý nos. Úzkonosí jsou dále rozděleni do nadčeledí: kočkodanovití (Cercopithecoidea), která zahrnuje opice Starého světa a hominoidi (Hominoidea), ke kterým jsou klasifikováni velcí lidoopi a menší lidoopi (Michellini 2016).

4.1.4 Morfologie trávicí soustavy a její odlišnosti a zvláštnosti

Trávení začíná již v ústní dutině. Probíhá zde mechanické zpracování potravy, které je zajišťováno pomocí zubů. S výjimkou ksukola ocaseatého si primáti zachovali všechny čtyři

typy zubů a chrup má až 36 zubů. Existují různé specializace v předních částech chrupu, a to zubní hřeben (používán při ošetřování a krmení), který je utvořen v oblasti spodních řezáků (lori, lemur a komba), sexuální dimorfismus ve velikosti špičáků u primátů Starého světa. Ksukol ocasatý získává přístup k dužině ovoce a k larvám hmyzu pomocí jediné dvojice zvětšených řezáků, které průběžně dorůstají. Těmito řezáky prolamuje kůru a tvrdé plodiny (Berkovitz & Shellis 2018). Jak kosmani rodu *Cebuella*, tak rodu *Callithrix* mají dolní špičáky incisiformní a sotva delší než sousední řezáky. Takový chrup umožňuje těmto druhům vytvářet díry v kůře k extrakci rostlinných exudátů (Izawa 1975).

Třenové zuby primátů jsou buď s jedním hrbolem, se dvěma hrboley či se čtyřmi hrboley. Stoličky jsou kosodélníkové či lichoběžníkovité se čtyřmi či pěti nízkými hrboley (Berkovitz & Shellis 2018). Zubní vzorec je 0-2/1-2, 0-1/0-1, 2-4/2-4, 2-3/2-3 = 18-36 zubů. Jak je patrné ze zubního vzorce, počet řezáků je velmi variabilní. Primáti si však zachovávají jeden spodní řezák. Špičáky většinou bývají přítomné, ale také nemusí (Myers 2000).

Dále přijatá a rožvýkaná potrava postupuje do dalších částí trávicího traktu. Struktura stěny trávicího traktu má stejnou podobu u všech obralovců: vnitřní výstelka sliznice je oddělena pojivovou tkání od vnější trubice alespoň dvěma vrstvami svalů. Rozdíly v histologické struktuře rozdělují trávicí trakt na žaludek, tenké střevo (*duodenum*, *jejunum*, *ileum*), slepé a tlusté střevo (*caecum* a *colon*). Různé uspořádání sliznice a pojivové tkáně zjevně pomáhá trávení mechanicky a to mícháním, zpomalením průchodu potravy nebo zvětšením absorpční plochy (Chivers & Hladik 1980).

Primáty je možné rozdělit podle druhu přijmané potravy do tří hlavních skupin. Každá skupina má jiný typ trávicího traktu.

První skupina nazvaná faunivorní zahrnuje primáty živící se živočišnou potravou, jako jsou například bezobratlí, ryby a drobní obratlovci. Živočišná potrava poskytuje zdroj bílkovin a tuků, které jsou snadno stravitelné, a proto je trávicí trakt těchto zvířat relativně krátký a jednoduchý. Trávicí soustavu tvoří jednoduchý kulovitý žaludek, klikaté tenké střevo, krátké kuželovité slepé střevo (*caecum*) a jednoduchý hladký tračník (*colon*) (Chivers & Hladik 1980). Komba má žaludek, jehož tvar je podobný „balónu“, relativně krátké tenké střevo, slepé střevo střední velikosti a hladký, nekomplexní (jednoduchý) tračník (Clemens 1980). Trávicí trakt nártounů se skládá z tračníku, který je dlouhý asi jako jedna pětina délky tenkého střeva, spirálního slepého střeva, které je dlouhé jako polovina tračníku (National Research Council 2003).

Druhou skupinou jsou frugivorní primáti. Jedná se o druhy, které se živí rostlinou potravou, zahrnující ovoce v nezralé (květy) a zralé (plody) formě, semena a hlízy. Tento druh potravy obsahuje sacharidy s krátkým řetězcem, které jsou rychle hydrolyzovány v oblasti tlustého střeva, absorbovány a okamžitě využity. V této skupině je většina primátů, ale jejich strava se neskládá pouze z ovoce a zmíněných druhů potravy, je doplněna o hmyz či o listy. Trávicí trakt těchto primátů vykazuje jen málo strukturální specializace, existují však rozdíly mezi některými druhy (Chivers & Hladik 1980).

Základní struktura žaludku frugivorních primátů je jednoduchá a tvar kulovitý (Hill 1958).

U žaludku kosmanů je více protáhlý fundus (rozšířená část žaludku uložená pod bránicí), zatímco primáti z čeledi malpovití mají více specializovaný žaludek, který má kulovitý fundus, kuželovité tělo a válcovitý vrátník (*pylorus*) (Chivers & Hladik 1980). Kotul, mirikina, chápani

rodu *Lagothrix* a rodu *Ateles* mají gastrointestinální trakt srovnatelný s trávicím traktem ostatních frugivorů, ale u většiny těchto druhů je proximální část tračníku rozšířena po celé své délce. Slepé střevo není segmentované (Stevens & Hume 1995). Kočkodani, s výjimkou hulmanů, mají lícni vaky, které umožňují krátkodobě skladovat potravu. Žaludek kočkodana, makaka a paviána je relativně jednoduchý, hladký a navazuje na něj krátké tenké střevo. Slepé střevo je segmentované *taenia coli* (ztluštění podélné svaloviny tlustého střeva), a to může podpořit mikrobiální rozpad rostlinného materiálu. Druhy komba velká (*Otolemur crassicaudatus*) a lemur vari (*Varecia variegata*) jsou poloopic, které mají prominentní slepé střevo, ale slepé střevo lemura vari je delší a složitější než u komby velké. Zvětšení tračníku nebo slepého střeva u gibona rodu *Hylobates*, makaka rhesus (*Macaca mulatta*), kočkodana diadémového (*Cercopithecus mitis*) a kočkodana obecného (*Cercopithecus aethiops*) napomáhá bakteriální fermentaci listového materiálu v potravě (Bourton et al. 1991; Sakaguchi et al. 1991). Vřešťani se také živí hojně listím, vykazují největší složitost s velkým kulovitým žaludkem, zužujícím se směrem k ohnutému trubkovitému vrátníku, který je chráněn silnou oporou (slizniční řasy vyzařují z kardia a probíhají podélně tělem). Chápani rodu *Ateles* jsou jedni z nejvíce frugivorních druhů. Jejich žaludek je zvětšený a je ve tvaru písmena J. Primáti Starého světa, s výjimkou hulmanů, mají samostatný žaludek s hladkými stěnami. Hominoidi mají žaludek více kulovitý jako je tomu u gibbonů, ještě více kulovitý žaludek mají gorily, u šimpanzů a orangutanů je více protáhlý. *Duodenum* neboli dvanáctník je obecně ve tvaru písmene C narozdíl od dvanáctníku jiných savců, u kterých je ve tvaru písmene U a je prodloužené. Někteří zástupci z čeledi malpovití a všichni zástupci úzkonosých primátů mají dvanáctník retroperitoneální (nachází se za podbřišnicí). Slepé střevo je velké u frugivorních poloopic, krátké a široké u kosmanů, tvar háčku má slepé střevo u malpovitých. U úzkonosých primátů je slepé střevo v základu kulovité, tělo je krátké a prostorné, vrchol je tupý a kuželovitý s terminálním vermiformním appendixem (ve tvaru šneka) u nadčeledi hominoidi. Tračník je jednoduchý a rovný u malpovitých, příkladem je kotul. Malpa a mirikina mají příčný tračník. Příčný tračník mají primáti titi, uakari a chvostan. U čeledi kosmanovití, u chápanů rodu *Lagothrix* a u všech úzkonosých primátů je prodloužení (a překládání) střeva. *Taenia coli* (zmenšení podélného svalu) chybí u kotula, malpy a u poloopic, ale může být jedno či dvě u outloně a poto. Lemuři rodu *Lemur*, většina úzkonosých primátů, malpovití a kosmanovití mají tři, s výjimkou gibbonů, kteří mají čtyři (Hill 1958). *Ansa coli*, smyčka v příčném tračníku je běžná u poloopic. Tato část tračníku je dlouhá a závislá u lidoopů. Rozsáhlý tračník gibbonů poukazuje na významný obsah listů v jejich stravě a jeho potenciálu k fermentaci.

Třetí skupinou jsou listožraví primáti neboli folivorní. Jejich potravu tvoří mladé a zralé listy, trávy, stopky, ale také kůra a pryskyřice. Tato potrava obvykle obsahuje bílkoviny a sacharidy s dlouhým řetězcem, které vyžadují fermentaci v žaludku nebo tlustém střevě (Chivers & Hladik 1980). Folivorní primáti mají řadu adaptací trávicí soustavy, které podporují symbiotickou mikrobiální fermentaci a mechanické působení k degradaci strukturní a chemické ochrany rostlin. Dvě hlavní adaptace zahrnují zvětšení žaludku nebo zadní části trávicího traktu k přízpůsobení mikrobiální fermentaci (Parra 1978; Langer 1988).

Sacharidy s dlouhým řetězcem, které mají dominantní zastoupení v listech, trávách, stopkách, kůře a pryskyřici, které tato zvířata spotřebovávají, vyžadují značnou degradaci symbiotickými organismy. Nejvíce nápadnou adaptací jsou komory pro bakteriální fermentaci celulózy a pro absorpci těkavých mastných kyselin a dalších metabolitů ať už v žaludku, tak v

tlustém střevě. Tato dichotomie by mohla maskovat další diverzifikaci, jak je patrné z rozšíření tračníku nebo namísto slepého střeva, prezence nebo absence cékotrofie, variace ve struktuře žaludku (Chivers & Hladik 1980). Zástupci hulmanů mají adaptace v přední části trávicího traktu, které nabízí místo primární mikrobiologické aktivity (Caton 1998). Žaludek se rozdělil kvůli zpracování množství celulózy do několika oddílů a získal podobnost se žaludkem přežvýkavců (National Research Council 2003).

Tlusté střevo je rozšířeno u těch druhů poloopic, které se živí listy nebo pryskyřicí (Chivers & Hladik 1980). U lemurů rodu *Lepilemur* je mechanismus podobný refekci (potrava prochází střevy dvakrát), který umožňuje efektivní využití stravy s vysokým obsahem vlákniny (Hladik & Charles-Dominique 1974). Tento případ cékotrofie je jedinečný mezi primáty a pomáhá vysvětlit, proč mají jedno z nejkratších tenkých střev mezi savci, stejně jako výskyt podlouhlého a stočeného slepého střeva, které mají makiovití rodu *Phaner* a kombovití rodu *Euoticus*. Vzhledem k tomu že pryskyřice vyžaduje pro její trávení fermentaci, jsou druhy požírající pryskyřici klasifikovány jako folivorní, spolu s primátem indri, který vykazuje podobné vlastnosti a je opravdu folivorní (Chivers & Hladik 1980).

Pro lepší pochopení anatomie trávicího traktu primátů jsou součástí přílohy č. 1 obrázky trávicí soustavy některých druhů a rodů.

4.1.5 Fyziologie trávicí soustavy

Gastrointestinální trakt je v podstatě trubice prostupující ventrální částí těla. Začíná v dutině ústní a zakončuje ji anus. Potrava je zpracovávána ve čtyřech fázích. První fází je požití potravy, následuje druhá fáze – trávení. V této fázi je potrava rozmělněna jak mechanicky, tak chemicky. Třetí fáze je absorpce neboli vstřebávání, v tuto chvíli jsou důležité látky z potravy roznášeny do kardiovaskulárního a lymfatického systému pro distribuci do buněk. Poslední částí je vyloučení (defekace). Tělo v této fázi vyloučí nestravitelné produkty z potravy (Tortora & Anagnostakos 1987).

Lumen je pokryt vrstvou absorpčních buněk (sliznice). Na vnější části lumenu se nachází hladká svalovina a pojivové tkáně, které obsahují cévy (Karasov & Diamond 1988). Rozdíly v histologické struktuře stěny vedou k diferenciaci odlišných částí trávicího traktu: žaludek, tenké střevo a tlusté střevo (*cecum* a *colon*) (Davenport 1978; Chivers & Hladik 1980).

Žaludek má hlavní chemickou roli v trávení bílkovin. Zde jsou bílkoviny zpracovány pomocí působení pepsinu, trypsinu a chymotrypsinu. V tenkém střevě se pak uskutečňuje trávení lipidů (Tortora & Anagnostakos 1987). V trávení sacharidů, zvláště komplexních sacharidů můžeme pozorovat specializaci v trávicím traktu u primátů a jiných savců, a to zejména v oblasti žaludku a ve střevě. Sacharidy jsou v podobě mono-, di- a polysacharidů. Monosacharidy jako je glukóza a fruktóza jsou tělem snadno vstřebávány a jsou přímo využity v běžných metabolických procesech. Disacharidy jako je sacharóza či laktóza, musí být hydrolyzovány na jednoduché sacharidy v tenkém střevě, poté jsou vstřebávány a využity (Schmidt-Nielson, 1997). Škrob je zásobárnou energie mnoha druhů rostlin. Jedná se o polysacharid. Polysacharidy jako je škrob rozkládá enzym amyláza. Primáti ji vylučují v pankreatu a slinách, tudíž trávení škrobu začíná již v tlamě (ústech). Funkcí amylázy je rozštěpit složité cukry (polysacharidy) na sacharidy jednodušší (disacharidy). Disacharidy pak mohou být hydrolyzovány v tenkém střevě. Zajímavostí je, že amyláza nalezená ve slinách

kočkodanů je mnohem více schopná škrob rozkládat oproti amyláze nalezené v lidských slinách (Jacobsen 1970; Rahaman et al. 1975) Například Rahamen et al. (1975) zjistili, že několik jedinců makaka kápoového (*Macaca radiata*), za méně než pět minut, dokázalo zpracovat asi 50 % škrobu v jejich tlamě. Murray (1975) také objevil vysokou hladinu alfa-amylázy v průšně tekutině, která může naplnit až jednu třetinu uvolněného lícního vaku a konstatoval, že tento trávící enzym je dostatečně účinný v trávení potravy s vysokým obsahem sacharidů.

U obratlovců, včetně primátů neexistuje v trávícím traktu enzym na štěpení celulózy. Což je velmi zajímavý fakt vzhledem k tomu, že mnoho obratlovců využívá rostlinný materiál jako hlavní zdroj energie (Milton 1986). Trávení těchto strukturních sacharidů probíhá u primátů a ostatních obratlovců pomocí symbiotických mikroorganismů, kteří žijí v jejich trávícím traktu. Tento proces můžeme označit termínem fermentace. Při fermentaci dochází k degradaci strukturálních složek stěn rostlinných buněk pomocí celulolytických bakterií. Jako vedlejší produkt této aktivity uvolňují celulolytické bakterie těžké mastné kyseliny známé jako mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Zvíře využívá tyto kyseliny (kyselina octová, kyselina máselná, kyselina propionová) jako snadno dostupný zdroj energie v krevním řečišti nebo v konečném případě ke skladování glukózy v játrech (Milton 1993; Stevens & Hume 1995). Ostatní konečné produkty fermentace jsou oxid uhličitý, metan a mikrobiální buňky. Oxid uhličitý a metan nejsou pro tělo užitečné a jsou vyloučeny z těla (Parra 1978). Mikrobiální buňky však užitečné jsou. Po smrti symbiotických bakterií, se díky lysozymu (trávící enzym) rozpadnou buněčné stěny bakterií, redukuje se mikroby do formy, která je využitelná jako protein (Stewart et al. 1987; Milton 1993).

Dříve byli primáti považováni za neefektivní rozkladače strukturních sacharidů (Bryant 1978). Studie však ukázaly, že dochází k rozsáhlé mikrobiální aktivitě, a to především v kolonu a céku, kde probíhá mikrobiální fermentace a výroba organických kyselin (Clemens & Phillips 1980; Bruerton & Perrin 1991). Například vřešťan pláštikový (*Alouatta palliata*) patří mezi nejrychlejší fermentátory mezi savci (Milton & McBee 1983).

4.1.6 Dieta

Hlavní potrava přijímaná primáty může být rozdělena na rostlinnou (květy, ořechy, listy, ovoce, semena, jádra, trávy, kůra, kořeny, stonky a hlízy) a živočišnou (ptáci, ještěrky, ptačí vejce, netopýři a malí hlodavci, žáby, korýši a hmyz). U primátů je těžké stanovit pevná pravidla jejich diety. Přestože existují určité preference potravy, všeobecnost je pro primáty více charakteristická než vyhrazenost. Primáti jsou všežravci, jak také dokládá fyziologie jejich zažívací soustavy. Nalézáme jen malé množství příkladů potravní specializace. Listožraví primáti, skládající se z celé podčeledi *Colobinae*, která zahrnuje guerézy a langury nejsou výlučně listožraví, sezónně se živí květy, ovocem a v některých případech semeny. Vřešťani, opice nového světa mají podobné potravní preference. Lidoopi se živí ovocem. Mnoho menších nočních primitivních druhů (kombovití, makiovití, lemurovití, ksukol ocaseť, loriovití) jsou v podstatě hmyzožraví. Nártoun je pravděpodobně jediný primát, který je výlučně masožravý, živí se hmyzem, ještěrkami a hady. Větší denní lemurové (např. sífaka malý, indri) jsou více vegetariánští a jejich stravu představuje ovoce, semena a listy. Kosmani rodu *Callithrix* jsou hmyzožraví a také se živí rostlinnými výpotky (pryskyřicí), zatímco mírně větší tamaríni rodu *Saguinus* jsou všežraví (Groves & Napier 2018).

Menší primáti mají tendenci jíst více živočišné potravy a větší primáti více rostlinné potravy (Berkovitz & Shellis 2018). Důvodem je, že hmyz je malý a pro velké zvíře není snadné ho chytit. Na druhé straně celulózové a hemicelulózové složky listů vyžadují složité trávicí procesy, čehož nebude zvíře malé velikosti schopné. Ovoce však nepředstavuje žádné dietní omezení (Groves & Napier 2018).

Potrava primátů se skládá ze tří hlavních živin a těmi jsou proteiny, lipidy a sacharidy (Tortora & Anagnostakos 1987). Nejrozšířenějším sacharidem je polysacharid celulóza (Sharon 1980). Tento polysacharid společně s hemicelulózou, ligninem, pektinem tvoří primární složku buněčných stěn rostlin a představuje tak velký podíl dostupného energetického obsahu (Blaxter 1962; Sharon 1980; Alexander 1993). Tyto sloučeniny jsou hlavním stavebním materiálem rostlin, jsou označovány jako strukturní sacharidy. Jsou extrémně nerozpustné a odolné vůči chemickým vlivům (Richard 1985; Schmidt-Nielson 1997). Zatímco někteří bezobratlí živočichové mají v trávicím traktu obsažen enzym, který dokáže metabolizovat celulózu, obratlovci takovýto enzym nemají. Navzdory tomu se rostlinný materiál stal pro mnoho obratlovců, včetně primátů dominující složkou v jejich potravě (Milton 1986). Tyto komplexní sacharidy jsou pak zdrojem uhlíků pro střevní bakterie a další mikroorganismy, které produkují enzymy, jež umožňují jejich rozklad a využití. Složení diety tak ovlivňuje střevní mikrobiom daného jedince (Voreades et al. 2014).

4.1.7 Mikrobiota trávicího traktu primátů

Mikrobiota gastrointestinálního traktu zvířat a lidí je mikrobiální ekosystém s velkými rozdíly mezi živočišnými druhy, ale i mezi jednotlivci. Tento ekosystém obsahuje až 10^{14} bakterií (Ercolini et al. 2001; Walter 2008; Russell et al. 2011). Gastrointestinální trakt má různé části a v každé této části se bakteriální komunita liší (Cronin et al. 2011; Russell et al. 2011).

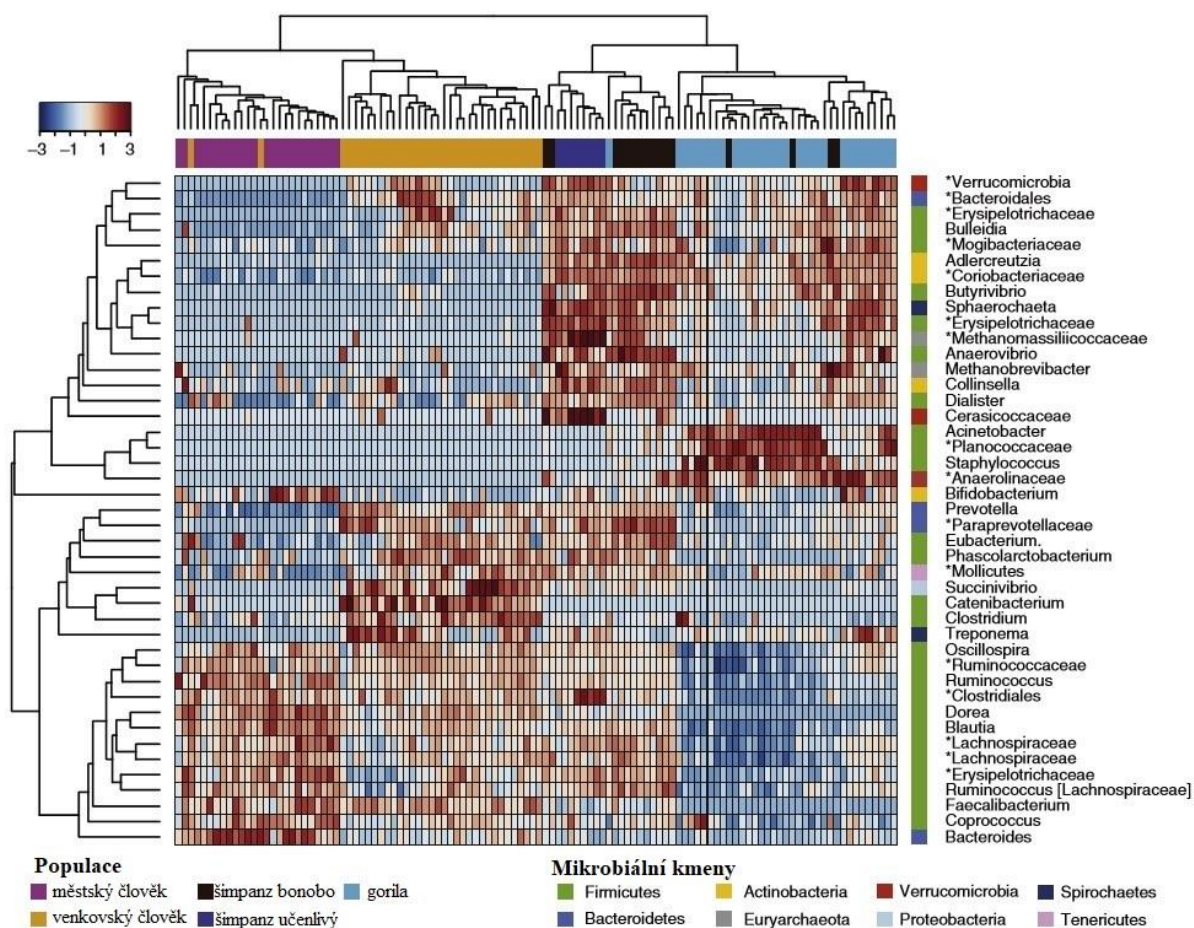
Mikrobiota gastrointestinálního traktu je komplex bakterií, virů, kvasinek a prvoků. Hraje klíčovou roli ve zdraví hostitele prostřednictvím začlenění do výživových, fyziologických a imunologických funkcí (Tannock 1995). Metabolická aktivita střevní mikrobioty se zdá srovnatelná s metabolickou aktivitou jater a zahrnuje zejména fermentaci exogenních a endogenních zdrojů uhlíku a energie (Isolauri et al. 2004). Jednou z hlavních schopností mikrobioty trávicího traktu je konvertovat nestravitelné rostlinné strukturní sloučeniny, jako je celulóza, do mastných kyselin s krátkým řetězcem, které mohou být absorbovány přímo hostitelem a využity pro energii (Flint et al. 2012). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou produkovány střevní mikrobiotou mohou poskytnout hostiteli až 70 % jejich každodenních energetických potřeb, usnadňují absorpci živin a zabraňují hromadění potenciálně toxických vedlejších produktů metabolismu (Flint et al. 2008; Neish 2009). Mikrobiota také reguluje metabolismus xenobiotik, což jsou látky, které nejsou vytvářeny přírodními procesy (Bjorkholm et al. 2009). Savci se spoléhají na střevní mikrobiotu, aby strávily potravu s velkým množstvím rostlinných strukturních sacharidů a toxinů (Amato et al. 2016). Faktory, jako je složení stravy (např. vláknina, obsah bílkovin), věk, zdraví, stres ovlivňují složení a aktivitu střevní mikrobioty. Bakteriální populace se liší mezi jednotlivci (Simpson et al. 2002).

Gastrointestinální trakt primátů je domovem bilionů bakterií, jejichž složení je spojeno s četnými metabolickými, autoimunitními a infekčními lidskými onemocněními. Primáti, kteří

žijí ve volné přírodě mají bohatou mikrobiotu narozdíl od primátů žijících v zajetí, kteří ztrácejí své původní mikroby a jejich trávicí trakt osidlují rody *Prevotella* a *Bacteroides* (Clayton et al. 2016). Primáti chovaní v zajetí mohou mít i odlišnou mikrobiotu (Amato et al. 2013). Odlišná a méně rozmanitá mikrobiota může učinit jedince náchylnějšího k invazi gastrointestinálního traktu potenciálními patogeny (Amato et al. 2016). Languři a vřešťani žijící ve volné přírodě mají velmi odlišnou mikrobiotu, ale u langurů a vřešťanů žijících v zajetí bylo zjištěno, že se jejich mikrobiota stává velmi podobnou. A to i přes velmi odlišnou stravu, odlišné místo původu a odlišnou fyziologii střev. Bylo zjištěno, že mikrobiota je ovlivněna dietou. Úroveň narušení diety a životního stylu je spojeno s narušením přirozené střevní mikrobioty. Mikrobiota primátů v zajetí je charakteristická ztrátou rozmanitosti. Genetika hostitele, i když pravděpodobně ovlivňuje mikrobiotu trávicího traktu, má mnohem menší vliv na mikrobiotu trávicího traktu než samotné zajetí. Porucha výživy v zajetí je pravděpodobně hybnou silou pro změnu mikrobioty trávicího traktu. Ztráta vlákniny může vést ke ztrátě základní biologické mikrobiální rozmanitosti u primátů v zajetí, ale i u lidí (Clayton et al. 2016).

Všežravé opice nového světa vykazují větší podobnost střevní mikrobioty s mikrobiotou člověka než velcí lidoopi, i přesto že jsou naši nejbližší evoluční sousedé (Ley et al. 2008).

Na obrázku můžeme vidět tepelnou mapu taxonů rozlišující mikrobiotu trávicí soustavy člověka, šimpanze, šimpanze bonobo a gorily. Každý sloupec představuje jedince a každá řada představuje bakteriální rod či čeleď. Lidé a subhumánní primáti tvoří dvě odlišné fylogenetické větve a u lidí ještě dvě další větve. Jedna větev je založena na tradičních životních strategiích (Tanzanie, Malawi, Peru, Venezuela) a druhá větev industrializovaná (USA a Itálie). Mezi subhumánními primáty je střevní mikrobiota velice podobná mezi šimpanzi (*Pan troglodytes*) a šimpanzi bonobo (*Pan paniscus*). Gorily však vykazují vysoký stupeň substruktury. Podobné mikrobiální vzorce sdílené mezi některými šimpanzi a gorilami byly přisuzovány sympatrickému mikrobiálnímu přenosu. V případě výskytu rodu *Bifidobacterium* je partneré vyšší zastoupení u lidí z industrializované společnosti, dále je pak četné u všech uvedených skupin primátů, ale jsou zde častější rozdíly na úrovni jedinců (Moeller et al. 2013).



Obrázek č. 1 - Tepelná mapa rodových taxonů rozlišující mikrobiotu trávicí soustavy člověka, šimpanze, šimpanze bonobo a gorily (Schnorr et al. 2016).

4.2 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie můžeme nalézt v různých ekologických nikách. Nejvíce z nich bylo identifikováno u zvířat, a to hlavně u savců v období mléčné výživy. Byly však izolovány také u hmyzu, konkrétně u včel a čmeláků (Bunešová et al. 2014). V posledních letech stoupá počet nově popsáných bifidobakteriálních druhů především z trávicího traktu novosvětských opic (Modesto et al. 2017; Modesto et al. 2018; Lugli et al. 2018).

4.2.1 Taxonomie

V minulosti byly bifidobakterie zařazeny do rodu *Lactobacillus* jako *Lactobacillus bifidus*. Později byly klasifikovány v samostatném rodě *Bifidobacterium* (Mitsuoka 1984). Tento rod náleží do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteridae*, řádu *Bifidobacteriales* a čeledi *Bifidobacteriaceae* (Garrity et al. 2004).

4.2.2 Historie

Bifidobakterie objevil poprvé Tissier roku 1900 v dětské stolici. Izoloval bakterii se zvláštním a charakteristickým tvarem Y a pojmenoval ji *Bacillus bifidus*. Tato bakterie byla anaerobní, gram-pozitivní a nevytvářela plyn během růstu (Sgorbati et al. 1995).

Na začátku 20. století Orla-Jensen v podrobném článku o bakteriích, které produkují kyselinu mléčnou, klasifikoval *Bacillus bifidus* jako součást čeledi *Lactobacteriaceae* a v roce 1924 navrhl tuto bakterii jako samostatný druh (Sgorbati et al. 1995).

V roce 1957 poprvé zjistil Dehnart, že existuje více biotypů bifidobakterií a navrhl schéma pro diferenciaci těchto bakterií založené na fermentačním profilu sacharidů. Pak v roce 1963 Reuter rozpoznal 7 druhů bifidobakterií, včetně známého *Bifidobacterium bifidum*. O pár let později byl objasněný charakteristický metabolismus hexóзовé fermentace. Klíčový enzym je fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza. V roce 1970 se začala využívat hybridizace DNA, aby se rozpoznali nové skupiny, ale také zhodnotily již stávající druhy. Roku 1974 byly bifidobakterie klasifikovány do rodu *Bifidobacterium* a tento rod obsahoval 8 druhů. S rozvojem metod identifikace a zlepšením klasifikace bakterií bylo uznáno v tomto rodu 24 druhů a po čase vzrostl počet druhů na 32. V roce 1997 navrhli Stackebrand a kolegové novou hierarchickou strukturu, na základě analýzy genu 16S rRNA, shromažďující rod *Bifidobacterium* a rod *Gardnerella* do jedné čeledi *Bifidobacteriaceae* a do řádu *Bifidobacteriales* (Biavati et al. 2000).

V současnosti je uznáno 70 druhů a 10 poddruhů (bacterio.net).

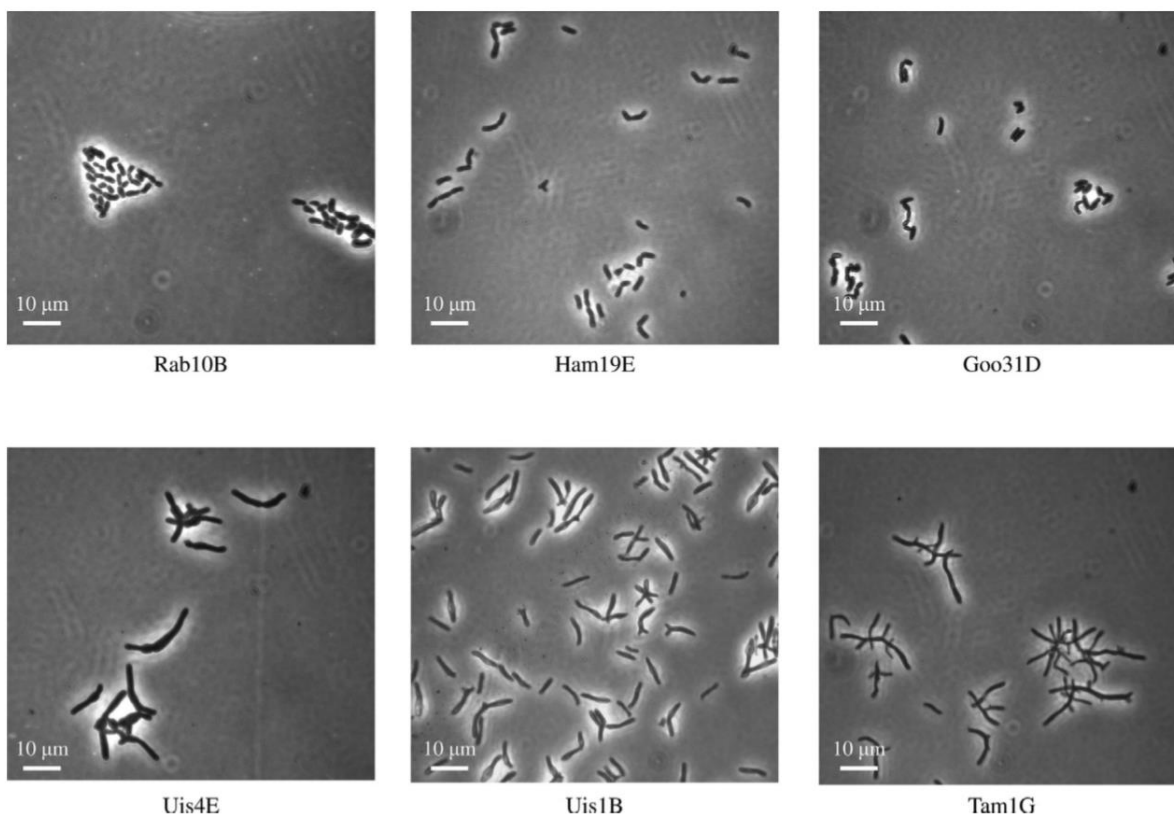
4.2.3 Morfologie

Bifidobakterie mají různé tvary včetně krátkých, zakřivených tyček, kyjovitých tyček a rozvětvených tyček ve tvaru písmene Y. Ukázka morfologie bifidobakterií zobrazených pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem je na obrázku číslo 1. Jsou nepohyblivé, anaerobní, gram-pozitivní, nevytváří spóry ani plyn a jsou katalázanegativní (Sgorbati et al. 1995). Buňky se často barví nepravidelně methylenovou modří (Biavati & Mattarelli 2012).

Bifidobakterie jsou bohaté na C+G (cytosin + guanin). Vyskytují se buď samostatně, ve shlucích či v řetězcích s mnoha elementy (Felis & Dellaglio 2007). Mohou se vyskytovat v agregátech ve tvaru hvězdy nebo ve „V“ uspořádání či v uspořádání „palisády“ (Biavati & Mattarelli 2012).

Buněčná stěna bifidobakterií má typickou Gram-pozitivní strukturu, která je tvořena silným peptidoglykanovým obalem. Tento obal obsahuje polysacharidy, proteiny, kyselinu teichovou a lipoteichovou (Biavati et al. 2000). Kompozice aminokyselin u bazických tetrapeptidů mureinu se liší mezi druhy a/nebo kmeny stejného druhu, což umožňuje jejich diferenciaci (Lauer & Kandler 1983; Tamime et al. 1995). Glukóza, galaktóza a často ramnóza se nacházejí jako složky polysacharidů, které jsou v buněčné stěně rodu *Bifidobacterium*. Existují kvalitativní a kvantitativní rozdíly mezi druhy, kmeny a růstovými podmínkami (Biavati et al. 2000). S polysacharidovými řetězci tvoří vazby kyseliny lipoteichové a jsou považovány za důležité pro buněčnou adhezi ke stěně střeva (Iwasaki et al. 1990). Imunochemické studie ukázaly, že kyseliny lipoteichové jsou běžným antigenem u rodu *Bifidobacterium*. Proteiny a kyseliny lipoteichové určují hydrofobní charakter povrchu bifidobakterií (Op Den Camp et al. 1985).

Kolonie jsou hladké, konvexní s rovnými okraji. Barevná škála kolonie je od krémové až po bílou. Mají měkkou konzistenci a jsou lesklé (Biavati & Mattarelli 2012).



Obrázek č. 2 - Morfologie rodu *Bifidobacterium*, s využitím fázového kontrastního mikroskopu, 10 µm, Rab10B – *B. italicum*, Ham19E – *B. criceti*, Goo31D – *B. anseris*, Uis4E – *B. margollesii*, Uis1B – *B. parmae*, Tam1G – *B. imperatoris* (Lugli et al. 2018)

4.2.4 Růst (teplota a pH)

Uvedená optimální teplota pro růst lidských kmenů bifidobakterií je 36-38 °C, zatímco u kmenů zvířecích je 41-43 °C a může být i vyšší, například *B. thermacidophilum* má optimální teplotu k růstu až 49,5 °C (Dong et al. 2000). Pro diferenciaci zvířecích a lidských kmenů může být použita teplota 46 °C. Zvířecí kmeny jsou schopny při této teplotě růst, lidské však ne (Gavini et al. 1991). Pod 20 °C bifidobakterie nerostou s výjimkou druhu vyskytujícího se u prasat *B. psychroaerophilum*, které roste při 8 °C (Simpson et al. 2004). Jak zde již bylo uvedeno, bifidobakterie jsou kataláza negativní až na výjimky *B. indicum* a *B. asteroides* (Felis & Dellaglio 2007). Přes skutečnost, že jsou bifidobakterie striktně anaerobní, zdá se, že existují druhy, které dokáží přežít za přítomnosti kyslíku. Zdálo se, že kmenu *B. boum* a *B. thermophilum* roste dobře i za 20% koncentraci kyslíku. Tolerance kyslíku závisí na druhu a některé druhy vykazují toleranci kyslíku pouze za přítomnosti oxidu uhličitého (Kawasaki et al. 2006). Bifidobakterie, stejně jako jiné živé organismy, mohou nastartovat sofistikované molekulární mechanismy, aby se vyrovnaly s tepelným stresem a chránily buňku před poškozením způsobeným hromaděním nerozložených a/nebo špatně složených proteinů (Wickner et al. 1999).

Optimální pH pro růst bifidobakterií je 6,5 až 7,0. Růst ustává při pH 4,5-5,0 a nižším a při 8,0-8,5 a vyšším (Biavati & Mattarelli 2012). Některé druhy však vykazovaly růst i při pH 3-5 (*B. animalis* ssp. *animalis* a *B. animalis* ssp. *lactis*) (Matsumoto et al. 2004). Velmi důležitá vlastnost pro přežití v horních částech gastrointestinálního traktu je schopnost odolat žlučovým

solím nebo kyselému prostředí. Tato schopnost se jeví jako vysoce variabilní u členů rodu *Bifidobacterium* (Bunešová et al. 2014).

4.2.5 Metabolismus

Analýzy genomu bifidobakterií ukazují, že obsahují geny pro syntézu alespoň 19 aminokyselin, přičemž také kódují všechny očekávané enzymy potřebné pro biosyntézu pyrimidinových a purinových nukleotidů, jakož i ty, které jsou potřebné pro syntézu určitých vitamínů B (Ventura et al. 2009). Bifidobakteriální druhy mají genetickou informaci, která je nutná k posunu mnoha monosacharidů nebo disacharidů do fruktóza-6-fosfát metabolické cesty (Schell et al. 2002; Ventura et al. 2007).

Z genomové analýzy se zdá, že bifidobakterie mohou produkovat celou řadu vitamínů B včetně thiaminu (B1), pyridoxinu (B6), kyseliny listové (B11) a kyseliny nikotinové nebo niacinu (B3). Některé druhy obsahují geny pro biosyntézu riboflavinu (B12) (Sela et al. 2008; Ventura et al. 2009). Schopnost některých bifidobakteriálních druhů produkovat vitamíny byla zkoumána jako možná probiotická vlastnost (Pompei et al. 2007).

Bifidobakterie jsou sacharolytické organismy a obvykle produkují kyselinu octovou a mléčnou v poměru 3:2, ale bylo prokázáno, že poměr závisí na druhu či kmenu, a také utilizovaném substrátu. Některé bifidobakterie mohou vytvářet také další organické kyseliny a ethanol, které mají silný vliv na růstové charakteristiky druhů. Kyselina máselná a propionová nejsou produkovány. Bifidobakterie neprodukují CO₂ s výjimkou degradace glukonátu (Biavati & Mattarelli 2012).

Bifidobakterie výlučně katabolizují hexózy prostřednictvím charakteristické metabolické cesty, která zahrnuje klíčový enzym fruktóza-6-fosfoketolázu. Tento enzym byl považován za taxonomickou charakteristiku pro identifikaci bifidobakterií na úrovni rodu, avšak v současnosti jej lze považovat za taxonomický marker pro celou čeleď *Bifidobacteriaceae* (Biavati & Mattarelli 2012). Obecně platí, že bifidobakterie mají schopnost fermentovat fruktózu, galaktózu a glukózu (Leahy et al. 2005). Existují však i druhy které neumí fermentovat glukózu (Bunešová et al. 2014). Fermentační schopnost různých substrátů, zahrnující sacharidy a jejich deriváty a alkoholy je druhově specifická (Cronin et al. 2011). Některé druhy jsou schopny fermentovat laktózu a růst v mléce. Schopnost fermentovat laktózu je charakteristická pro druhy izolované z mléka a mléčných výrobků, jako je *B. crudilactis*, *B. mongoliense* (Delcenserie et al. 2013) a *B. animalis* ssp. *lactis*, ale byla také popsána u jiných druhů (Biavati & Mattarelli 2012). Bifidobakterie výhodně využívají mono-, di- či oligosacharidy. Oligosacharidy s nižším stupněm polymerace jsou výhodnější než polymery s vyšší molekulovou hmotností (Gibson 2004). Fyziologické studie ukázaly, že bifidobakterie mohou využívat širokou škálu komplexních sacharidů jako např. xylo-oligosacharidy, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, isomalto-oligosacharidy, oligosacharidy sojových bobů a další rostlinné oligosacharidy (Kondepudi et al. 2012).

Bifidobakterie také metabolizují nestravitelné sacharidy jako je škrob. Kapacita každého druhu na využití komplexních sacharidů je odlišná. Degradace škrobu je vysoce závislá na hladinách a vlastnostech enzymů degradujících škrob, které jednotlivé druhy produkují, stejně tak jako na esterifikačně indukovaných strukturních defektech modifikovaných škrobů, které mění přístupnost k hydrolyzujícím enzymům, a i na bakteriální kolonizaci (Lim et al. 2014).

Bylo zjištěno, že většina živočišných bifidobakteriálních druhů je schopna využívat škroby, zatímco u lidských druhů je to jsou to například některé kmeny *B. adolescentis*, *B. angulatum* a *B. dentium* (Biavati & Mattarelli 2012).

Muciny jsou důležitým zdrojem uhlíku, dusíku a energie pro sacharolytické bakterie, včetně bifidobakterií rostoucích v tlustém střevě, kde je nabídka fermentovatelných substrátů obvykle omezena. Epiteliální povrchy gastrointestinálního traktu jsou pokryty vrstvou hlenu. Tento hlen tvoří hlavně voda a muciny (Horowitz 1967). Podle provedené studie bifidobakterie patří k bakteriím fermentující mucin u lidí, ale jejich význam pro degradaci mucinu u zvířat se jeví jako omezený (Killer & Marounek 2011). Schopnost utilizace a degradace mucinu byla potvrzena pouze u druhu *B. bifidum* lidského původu (Bunesova et al. 2018).

4.2.6 Ekologie a výskyt

Bifidobakterie jsou důležité komenzální mikroorganismy, které mají prvořadý význam v ekosystému trávicího traktu lidí, teplokrevných živočichů a včel (Sgorbati 1995). Jsou přítomny v různých ekologických nikách gastrointestinálního a genitourinárního traktu. Poměr je určován hlavně věkem a stravou. Dominují především v původní mikrobiotě kojence (Finegold 1983; Musilova et al. 2017). Nicméně, bifidobakterie jsou obvykle nalezené v trávicím traktu dospělých lidí, savců, a i některých jiných živočichů a můžeme je nalézt ve všech sekcích gastrointestinálního traktu. Jejich přítomnost ve vysokých počtech je spojena s dobrým zdravotním stavem hostitele (Cronin et al. 2011; Russell et al. 2011).

Výskyt bifidobakterií není omezen pouze na gastrointestinální trakt teplokrevných živočichů a lidí. Byly izolovány druhy z lidské vagíny (Verhelst et al. 2005); lidské krve (Hoyle et al. 2002); ve střevech čmeláka, včely medonosné a drvodělky fialové (*Xylocopa violacea*) (Killer et al. 2009; Killer et al. 2011; Alberoni et al. 2019); v mléčných potravinách (mléko, sýry) a mase (Meile et al. 1997; Gavini et al. 2006; Delcenserie et al. 2007; Watanabe et al. 2009); v odpadních vodách (Scardovi et al. 1979; Biavati et al. 1982). Byly také nalezeny v lidském zubním kazu a plaku (Modesto et al. 2016).

4.2.7 Bifidobakterie izolované z trávicího traktu primátů

Trávicí trakt primátů představuje spolu s lidmi a prasaty největší rezervoár bifidobakteriální rozmanitosti (Michelini et al. 2016).

Endo et al. (2012) izolovali a popsali pět druhů bifidobakterií z výkalů kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) a z tamarína žltorukého (*Saguinus midas*). *Bifidobacterium reuteri* a *B. callitrichos* byly izolovány z trusu kosmana bělovousého. *B. saguini*, *B. stellenboschense* a *B. biavatii* byly izolovány z trusu tamarína žltorukého. U gorily nížinné (*Gorilla gorilla gorilla*) byl izolován druh *B. moukalabense* z trusu dospělého jedince žijícího ve volné přírodě (Tsuchida et al. 2014). V roce 2015 byl izolován z trusu pět let starého lemura kata (*Lemur catta*) druh *B. lemurum* (Modesto et al. 2015). Z trusu lemura tmavého (*Eulemur macaco*) byl izolován a popsán kmen *B. eulemuris* (Michelini et al. 2016). Michelini et al. (2016) ve výkalech mládřat kosmana bělovousého (*Callithrix jacchus*) objevili druhy *B. myosotis*, *B. tissieri* a *B. hapali*. Z trusu tamarína pinčícího (*Saguinus oedipus*) byly izolovány a popsány tři nové druhy v roce 2016 a to *B. avesanii*, *B. ramosum*, *B. aerophilum*, kdy se jednalo o izolaci z fekálních vzorků dospělých jedinců (Michelini et al. 2016). Z fekálních vzorků

tamarína vousatého byla izolována *B. callitrichidarum*, jednalo se o dospělého jedince (Modesto et al. 2017). Modesto et al. (2018) izolovali *B. primatium*, *B. scaligerum*, *B. felsineum* z výkalů dospělých jedinců tamarína pinčího (*Saguinus oedipus*) a *B. simiarum* z trusu dospělého jedince tamarína vousatého (*Saguinus imperator*). Lugli et al. (2018) izolovali druhy *B. margollesii*, *B. parmae* u kosmana zakrslého (*Callithrix pygmaea*) a *B. imperatoris* u tamarína vousatého (*Saguinus imperator*). Výpis bifidobakteriálních druhů izolovaných z trávicího traktu primátů je uveden v Tabulce 1. Podle množství nově popisovaných druhů za poslední roky lze očekávat, že nové druhy budou dále přibývat. Přehled popsanych druhů je dostupný na bacterio.net.

Tabulka 1 – bifidobakterie izolované z trávicího traktu primátů

DRUH, PODDRUH	IZOLOVÁNO Z:	REFERENCE	SBÍRKOVÝ KÓD
<i>Bifidobacterium aerophilum</i>	Výkaly dospělého tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i>)	Michelini et al. 2017	DSM 100689
<i>Bifidobacterium aesculapii</i>	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	Modesto et al. 2014	DSM 26737
<i>Bifidobacterium biavatii</i>	Výkaly tamarína žlutorukého (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al. 2012	DSM 23969
<i>Bifidobacterium callitrichidarum</i>	Výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	Modesto et al. 2017	DSM 103152
<i>Bifidobacterium callitrichos</i>	Výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	Endo et al. 2012	DSM 23973
<i>Bifidobacterium catulorum</i>	Výkaly kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	Modesto et al. 2018	DSM 103154
<i>Bifidobacterium eulemuris</i>	Čerstvé výkaly Lemura tmavého (<i>Eulemur macaco</i>) žijícího v polopřirozených podmínkách	Michelini et al. 2016	DSM 100216
<i>Bifidobacterium felsineum</i>	Výkaly dospělých jedinců tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i>)	Modesto et al. 2018	DSM 103139
<i>Bifidobacterium hapali</i>	Výkaly mláďete kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	Michelini et al. 2016	DSM 100202
<i>Bifidobacterium imperatoris</i>	Výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	Lugli et al. 2018	LMG 30297
<i>Bifidobacterium lemorum</i>	Výkaly od 5 let starého lemur kata (<i>Lemur catta</i>)	Modesto et al. 2015	DSM 28807

<i>Bifidobacterium margollesi</i>	Výkaly kosmana zakrslého (<i>Callithrix pygmaea</i>)	Lugli et al. 2018	LMG 30296
<i>Bifidobacterium moukalabense</i>	Výkaly divoké gorily nížinné (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	Tsuchida et al. 2014	DSM 27321
<i>Bifidobacterium myosotis</i>	Výkaly mláděte kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	Michelini et al. 2016	DSM 100196
<i>Bifidobacterium parmae</i>	Výkaly kosmana zakrslého (<i>Callithrix pygmaea</i>)	Lugli et al. 2018	LMG 30295
<i>Bifidobacterium primatium</i>	Výkaly dospělých jedinců tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i>)	Modesto et al. 2018	DSM 100687
<i>Bifidobacterium ramosum</i>	Výkaly dospělého tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i>)	Michelini et al. 2016	DSM 100688
<i>Bifidobacterium reuteri</i>	Výkaly kosmana (<i>Callithrix jacchus</i>)	Endo et al. 2012	DSM 23975
<i>Bifidobacterium saguini</i>	Výkaly tamarína žlutorukého (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al. 2012	DSM 23967
<i>Bifidobacterium scaligerum</i>	Výkaly dospělých jedinců tamarína pinčího (<i>Saguinus oedipus</i>)	Modesto et al. 2018	DSM 103140
<i>Bifidobacterium simiarum</i>	Výkaly dospělého jedince tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	Modesto et al. 2018	DSM 103153
<i>Bifidobacterium stellenboschense</i>	Výkaly tamarína žlutorukého (<i>Saguinus midas</i>)	Endo et al. 2012	DSM 23968
<i>Bifidobacterium tissieri</i>	Výkaly mláděte kosmana bělovousého (<i>Callithrix jacchus</i>)	Michelini et al. 2016	DSM 100201
<i>Bifidobacterium vansinderenii</i>	Výkaly tamarína vousatého (<i>Saguinus imperator</i>)	Duranti et al. 2017	LMG 30126

DSM – německá sbírka mikroorganismů

LMG – belgická sbírka mikroorganismů

4.2.8 Izolace a kvantifikace bifidobakterií

Požadavek na selektivní kultivační média pro izolaci a stanovení počtu rodu *Bifidobacterium* je velmi reálný problém ve střevní a potravinové mikrobiologii. Bylo popsáno několik médií pro detekci těchto bakterií (Roy et al. 1997). Žádné z těchto médií se však nezdálo být zcela selektivní. Některá selektivní média navíc neumožňovala růst všech druhů rodu *Bifidobacterium* (Rada & Petr 2002). Bylo zjištěno, že mupirocin je selektivním faktorem

pro izolaci a kvantifikaci bifidobakterií, které se vyskytují ve fermentovaných mléčných výrobcích a ve výkalech (Rada & Koc 2000; Rada & Petr 2000). Lithná sůl mupirocinu inhibuje růst většiny bakterií mléčného kvašení používaných ve fermentovaných a nefermentovaných mléčných výrobcích (Bunešová et al. 2012; Ferraris et al. 2010). Dalším selektivním faktorem pro izolaci bifidobakterií ze vzorků stolice je kyselina octová, která potlačuje bakterie citlivé na nízké pH (Rada & Petr 2000). O další modifikaci a vylepšení média pro bifidobakterie se zasloužili Vlková et al. (2015), kdy médium s mupirocinem a kyselinou octovou obohatili o antibiotikum norfloxacin, který zvyšuje selektivitu při práci s komplexními vzorky jako je lidská stolice a zvířecí výkaly.

4.2.9 Identifikace bifidobakterií

Morfologie a kultivační charakteristiky jsou užitečné při počáteční identifikaci rodu *Bifidobacterium*. Nejvíce přímá a nejspolehlivější vlastnost pro přiřazení bifidobakterií na úrovni rodu je demonstrace enzymu fruktóza-6-fosfoketoláza (F6PPK) (Bunešová et al. 2014). Identifikace bifidobakterií na základě fenotypových charakteristik však ne vždy poskytuje jasné výsledky a je někdy nespolehlivá, protože bifidobakteriální buňky mohou měnit svou morfologii a fyziologické vlastnosti v závislosti na kultivačním médiu, růstu a kultivačních podmínkách (Ercolini et al. 2001; Satokari et al. 2003).

V současné době je pro identifikaci bakterií populární hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS - Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Některé studie dokonce uváděly, že se diagnostika stává revoluční díky aplikování MALDI-TOF MS (Vello et al. 2011). Tato metoda je také využívána pro identifikaci bifidobakterií (Bunešová et al. 2013; Stropfová & Lauková 2014; Bunešová et al. 2017).

Pro identifikaci bifidobakterií je k dispozici mnoho převážně molekulárních technik. Základní technika PCR byla široce využívána pro identifikaci bifidobakterií lidského původu, ale její použití pro klasifikaci bifidobakterií izolovaných ze zvířat je problematické, protože dostupných je pouze pár primerů pro *B. animalis* (Roy & Sirois 2000; Ventura & Zink 2002).

Techniky fingerprintingu, jako je analýza náhodně amplifikované polymorfní DNA (RAPD) a repetitivní PCR sekvence (REP-PCR) pracují na úrovni porovnání profilů kmenů a je spíše metodou genotypové charakterizace poskytující odlišení například v rámci jednoho druhu (Bunešová et al. 2017). Velkou výhodou těchto metod je to, že nevyžadují specificky konstruované primery a mohou být použity náhodné univerzální primery (Mayer et al. 2007; Bunešová et al. 2012). Zdá se tedy, že tento přístup je užitečný pro charakterizaci bifidobakterií živočišného původu. Například polymorfismus délky restrikčního fragmentu (RFLP) a pulzní gelová elektroforéza v poli (PFGE) jsou také vhodné pouze pro účely typizace a obecně neposkytují identifikaci druhu. Jsou-li k dispozici druhově specifické primery nebo sondy, nabízejí velmi rychlý způsob detekce cílových organismů (Temmerman et al. 2004).

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je jednou z mála technik, které umožňují rychlou mikrobiální analýzu komplexní bakteriální komunity u zvířat (Mrázek et al. 2008; Mayer et al. 2012).

Další často využívanou metodou detekce specifických bakterií v gastrointestinálních vzorcích je fluorescenční in situ hybridizace (FISH), i zde jsou dostupné sondy pro rod

Bifidobacterium. Značené sondy jsou hybridizovány s rRNA a bakterie jsou vizualizovány fluorescenční mikroskopií. Sondy specifické pro rod mohou být použity ke sledování výskytu a množství bifidobakterií ve vzorcích stolice nebo jiných nikách (Takada et al. 2004; Bunešová et al. 2012).

Průtoková cytometrická analýza je metoda, která umožňuje kvantitativní i kvalitativní analýzu vzorků. Bakterie ve vzorcích jsou fluorescenčně označeny za použití jednoho nebo více specifických barviv nebo sond, po kterých značený roztok prochází průtokovým cytometrem nebo třídičem buněk, aby se určila identita a množství bakterií (Bunthof & Abee 2002). Byla vyvinuta vícebarevná FISH metoda, která pomocí jediné reakce detekuje několik druhů bifidobakterií (Takada et al. 2004).

Další molekulární metodou, která se využívá k detekci, kvantifikaci a studiu mikrobiálních populací je kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Je také vysoce citlivá, specifická a umožňuje současnou detekci různých mikroorganismů, včetně bifidobakterií (Delroisse et al. 2008).

Většina situací však vyžaduje pouze identifikaci na úrovni druhů, pro které se používají techniky, jako je například sekvenování 16S rRNA nebo v minulosti hybridizace DNA-DNA. Identifikace pomocí srovnávání genu pro 16S rRNA napomohla v rámci taxonomického členění bifidobakterií (Ventura & Zink 2002). Nicméně pro kvalitní fylogenetické studie je potřeba využívat i další geny a metody jako je například MLST (Multilocus sequence typing) a sekvenování celého genomu (Killer et al. 2018).

Pro konečnou identifikaci a taxonomickou klasifikaci se doporučuje takzvaný polyfázický přístup, tedy kombinaci více nezávislých metod (Ventura et al 2007).

4.2.10 Bifidobakterie jako probiotika

Termín probiotika je odvozen z řečtiny a znamená „pro život“. Lilly & Stillwell (1965) poprvé použili tento termín, který popisoval probiotika jako „látky produkované jedním organismem, stimulují růst jiného organismu“ a tím pádem je tento termín opakem antibiotik.

Po dlouhou dobu používaná definice probiotik zněla takto: Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení stavu hostitele (FAO/WHO 2001). Aktuální definice zní: Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos (Hill et al. 2014). Jako probiotika jsou většinou využívány bakterie, které přirozeně sídlí v trávicím traktu. Často využívané jsou bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Rada 2011), ale také kvasinky rodu *Saccharomyces* (Islam 2016). Příznivý účinek probiotických bakterií je například imunostimulační, zmírnění zácpy, tlumení alergií, prevence kolorektálního karcinomu, prevence a podpůrná terapie zánětlivých střevních onemocnění a průjmů (Rada 2011).

Probiotické organismy mohou po požití upravovat rovnováhu a aktivity gastrointestinální mikrobioty, jejíž úloha je zásadní pro homeostázu střev (Chaucheyras-Durand & Durand 2010). Bifidobakterie jsou považovány za jeden z klíčových rodů v gastrointestinálním traktu. Existuje všeobecná domněnka, že jsou bifidobakterie užitečné při udržení odpovídající rovnováhy mikrobioty, což snižuje riziko infekce patogeny. Mohou mít pozitivní vliv na imunostimulaci hostitele. Tyto vlastnosti učinily bifidobakterie velmi atraktivními pro jejich využití jako

probiotika (Gaggia et al. 2010; Russell et al. 2011). Vybrané bifidobakteriální druhy musí přežít náročné podmínky v gastrointestinálním traktu hostitele a přetrvat. Orálně podávané bifidobakterie musí být tedy schopny se vyrovnat s různými výzvami, které se vyskytují napříč gastrointestinálním traktem, a to zejména kyselému pH a žaludečním enzymům v žaludku, se žlučí, s pankreatinem a dalšími enzymy v tenkém střevě. Tyto překážky v gastrointestinálním traktu mohou značně ovlivnit metabolický stav bakterií a jejich přežití, a tudíž jejich funkčnost (Sanchez et al. 2013).

Determinanty jako je věk, nemoci, složení stravy, postupy krmení a další parametry mohou ovlivnit mikrobiální rovnováhu v gastrointestinálním traktu a následně tak ovlivnit stravitelnost krmiv, dobré životní podmínky a zdraví jedince (Chaucheyras-Durand & Durand 2010; Simpson et al. 2002). Důležitým faktorem může být věk zvířat. Vzorke kolonizace během raného života jsou nestabilní a novorozená zvířata jsou pak náchylná k environmentálním patogenům. Počáteční kolonizace je pro hostitele velmi důležitá, protože bakterie mohou modulovat expresi genů v epiteliálních buňkách, čímž pro sebe vytváří příznivý biotop (Siggers et al. 2007).

Další příznivý účinek probiotik byl zaznamenán, když byly zahrnuty do stravy zvířat během období, které bylo pro zvíře a střevní mikrobiotu stresující (Chaucheyras-Durand & Durand 2010). Krmení probiotických bakterií snížilo infekce, průjmová onemocnění a úmrtnost, což odpovídá potřebám antibiotické léčby a snižuje výskyt a šíření bakterií rezistentních na antibiotika a residua antibiotik v mléce, mléčných výrobcích a masu (Abu-Tarboush et al. 1996).

Došlo také ke zvýšení výzkumu krmení bifidobakterií mladým hospodářským zvířatům, jako jsou telata a selata (Moore 2004; Shim et al. 2005; Ripamonti et al. 2011). Výsledkem je zlepšení přírůstku tělesné hmotnosti a konverze krmiva, snížení výskytu průjmů a lepší zdravotní stav. Pozitivní probiotický účinek byl zjištěn také u drůbeže (Mountzouris et al. 2007; Baffoni et al. 2012).

Bifidobakterie jsou velmi slibnými probiotiky, přestože jejich probiotické vlastnosti jsou druhově či kmenově specifické. Často se využívají v potravinářských a farmaceutických přípravcích a jejich aplikace při krmení zvířat roste. Nejčastěji používanými bifidobakteriálními druhy pro aplikaci v krmivech pro zvířata a v potravinách pro lidi jsou *Bifidobacterium infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis* ssp. *animalis*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve* (Fijan 2014). U zvířat se také používají *B. pseudolongum* ssp. *pseudolongum* a *B. thermophilum* (Gaggia et al. 2010).

Některé druhy bifidobakterií byly v minulosti využity např. v boji proti průjmu, pro zmírnění intolerance na laktózu, v boji s mikrobiálními infekcemi, při nespecifickém střevním zánětu (IBD), pro zmírnění zácpy, pro snížení cholesterolu, zkoumání vlivu bifidobakterií na imunitní funkce. Zajímavá je taky potenciální role rodu *Bifidobacterium* v prevenci rakoviny (Leahy et al. 2005)

Wang et al. (2016) ve své studii uvádí pozitivní vliv probiotik na fungování centrální nervové soustavy u lidí a zvířat. Byly využity také bifidobakterie, konkrétně druhy *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*. Ukázalo se, že probiotika byla schopna zlepšit úzkost, depresi a paměť.

4.2.11 Význam bifidobakterií pro hostitele

Bifidobakterie patří do převažující skupiny ve střevní mikroflóře lidí a zvířat (Mitsuoka 1992). Tvrdilo se, že bifidobakterie potlačují škodlivé mikroorganismy pomocí produkce kyseliny octové a mléčné (Rašić & Kurmann 1983). Bifidobakterie mohou dekonjugovat žlučové soli na volné formy, které mají více biocidní aktivity proti nežádoucím bakteriím. Řada bakterií ve střevě může syntetizovat nitrosaminy, které jsou potenciální karcinogenní sloučeniny. Bifidobakterie mohou tyto sloučeniny degradovat, což snižuje riziko rakoviny tlustého střeva (Shah 1997). Některé druhy bifidobakterií mohou vylučovat antimikrobikrobiální látku s širokým spektrem aktivity (Gibson & Wang 1994). Činnosti střevní mikroflóry mohou být vysoce specifické a bylo zjištěno, že například vznik bifidobakterií je důležitý pro rozvoj imunitního systému a pro udržení funkce střeva (Blum & Schiffrin 2003; Salminen et al 2005; Ouwehand 2007).

Interakce bifidobakterií mezi savcím gastrointestinálním traktem a jeho mikrobiotou také ovlivňuje vývoj a etiologii několika onemocnění: inzulinová rezistence (Dumas et al. 2006); Crohnova choroba (Gupta et al. 2000; Marchesi et al. 2007); syndrom dráždivého tračníku (IBS) (Sartor 2004; Martin et al. 2006); poravinové alergie (Bjorksten et al. 2001); gastritida a peptické vředy (Warren 2000; Marshall 2003); obezita (Ley et al. 2006; Turnbaugh et al. 2006); kardiovaskulární onemocnění (Pereira & Gibson 2002); rakoviny gastrointestinálního traktu (Dunne et al. 2001).

Ne všechny druhy v rámci rodu *Bifidobacterium* jsou prospěšné pro jejich hostitele. Celogenomevě sekvencovaný *B. dentium* Bd1 je například oportunistický patogen schopný acidogeneze, což je spojeno s demineralizací zubů a vznikem zubního kazu (Ventura et al. 2009).

5 Metodická část a materiál

5.1 Odběr vzorků

Do skleněné zkumavky s bujónem bylo odebráno malé množství čerstvé stolice (cca 1 g, velikost lískového oříšku). Pokud je to možné, tak by měla být stolice odebrána nejlépe přímo při defekaci u anusu, aby nedošlo ke kontaminaci odebraného vzorku.

Odběr byl proveden pomocí přiložené jednorázové tyčinky, která byla následně po odběru vyhozena. Zkumavka byla uzavřena a opatrně promíchána, tak aby byl celý vzorek ponořen do tekutiny. Není vhodné však míchat příliš intenzivně, jelikož by se odebraný vzorek mohl promíchat se vzduchem. Vzduch není dobrý pro anaerobní bakterie, které jsou v trávicím traktu. Bujón se nesmí vylít ani ulít.

Na zkumavce byl zaznamenán číselný údaj, který se nesmí smazat, bylo nadepsáno tedy voděodolnou fixou. Pokud byl proveden rozbor již v den odběru, byla zkumavka se vzorkem uchována v lednici. Pokud byl rozbor učiněn později bylo nutné zkumavku zamrazit.

Vzorky bylo nutné označit, aby bylo jasné, o jaké zvíře se jedná.

5.2 Použité vzorky

V této práci bylo použito 12 vzorků stolice získaných od 9 různých druhů primátů ze zoologických zahrad v České republice (Zoo Liberec, Zoo Olomouc, Zoo Plzeň) a na Slovensku (Zoo Bojnice). Seznam všech použitých vzorků a druhů primátů je uveden níže.

Tabulka č. 2 – Seznam použitých vzorků

ČÍSLO PRIMÁTA	DRUH PRIMÁTA	LATINSKÝ NÁZEV	ZOO	IZOLACE	TYP PRIMÁTA
PR1	Kosman zakrslý	<i>Callithrix pygmaea</i>	Liberec	Vzorek z výběhu	novosvětský
PR2	Kosman běločelý	<i>Callithrix geoffroyi</i>	Olomouc	Vzorek z výběhu	novosvětský
PR3	Kosman běločelý	<i>Callithrix geoffroyi</i>	Olomouc	Vzorek z výběhu	novosvětský
PR4	Tamarin vousatý	<i>Saguinus imperator</i>	Plzeň	Výtěr, samice	novosvětský
PR5	Tamarin žlutoruký	<i>Saguinus midas</i>	Plzeň	Vzorek z výběhu	novosvětský
PR6	Tamarin vousatý	<i>Saguinus imperator</i>	Plzeň	Výtěr, samec	novosvětský
PR7	Šimpanz	<i>Pan troglodytes</i>	Liberec	Vzorek z výběhu	starosvětský (lidoop)
PR8	Gibon zlatolící	<i>Nomascus gabriellae</i>	Olomouc	Vzorek z výběhu	starosvětský (lidoop)
PR9	Gibon zlatolící	<i>Nomascus gabriellae</i>	Bojnice	Vzorek z výběhu	starosvětský (lidoop)
PR10	Makak lví	<i>Macaca silenus</i>	Liberec	Vzorek z výběhu	starosvětský
PR11	Pavián pláštíkový	<i>Papio hamadryas</i>	Liberec	Vzorek z výběhu	starosvětský
PR12	Mangabej žlutobřichý	<i>Cercocebus agilis chrysogaster</i>	Liberec	Vzorek z výběhu	starosvětský

5.3 Použitá média pro detekci bifidobakterií

Pro zjištění přítomnosti a počtu bifidobakterií byla použita dvě různá média, a to agary: Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem (WSP) doplněný kyselinou octovou a mupirocinem WSP Mup a více modifikovaný WSP Mup agar s norfloxacinem (Bif-NORF). Také byly kontrolně stanoveny celkové počty anaerobních bakterií na WSP bez antibiotik a kyseliny octové. Kultivační podmínky byly obdobé jako pro bifidobakterie (Tabulka č. 3).

Příprava začala rozpouštěním agaru Wilkins-Chalgren v destilované vodě, kam byl přidán sojový pepton, cystein a tween. Vše bylo nutné dobře rozmíchat, rozvařit a nakonec sterilovat.

Po vytemperování na 48 °C byl přidán mupirocin, kyselina octová. Směs byla opět promíchána. Pro druhý bifidobakteriální agar je postup i složení shodné, jen byla přidána antibiotika mupirocin a norfloxacin (zde je kyselina octová součástí zásobního roztoku).

Tabulka č. 3 – složení použitých médií pro růst bifidobakterií

MÉDIUM	PODMÍNKY KULTIVACE	SLOŽENÍ SELEKTIVNÍHO MÉDIA NA 1000 ml
Wilkins-Chalgren (WSP Mup agar pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	48 h, anaerobní, při 37 °C	43 g Wilkins-Chalgren anaerob agar (OXOID), 5 g Sójový pepton (OXOID), 0,5 g Cystein (OXOID), 1 ml Tween (Sigma), 100 mg Muporocin, 100 µl ledová kys. octová
Modifikovaný agar s norfloxacinem (BIF-NORF pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	48 h, anaerobní, při 37 °C	43 g Wilkins-Chalgren anaerob agar (OXOID), 5 g Sójový pepton (OXOID), 0,5 g Cystein (OXOID), 100 mg Muporocin, 1 ml Tween (Sigma) 1 g Norfloxacin, 100 µl ledová kys. octová

5.4 Rozbor

Byla vytvořena ředící řada (2. až 9. ředění) pro rozbor vzorků. Byly anaerobně připraveny zkumavky s bujónem (9 ml/zkumavka).

Skleněná zkumavka na vzorek (1. ředění) byla zvážena před vložením vzorku a po vložení vzorku, aby bylo možné z rozdílů hodnot vypočítat množství vzorku, které aplikujeme do druhého ředění (byla vydělena hodnota 1 tímto rozdílem, to znamená: 1/rozdíl hmotností = hmotnost, kterou aplikujeme do 2. ředění).

Z každého ředění byl následně odebrán 1 ml média injekční stříkačkou pomocí jehly a aplikován do další zkumavky ředící řady. Je nutné pomocí kahanu sterilovat ožehnutím vždy víčko u každé zkumavky před odběrem, a i u zkumavky do které se bude pokračovat s dalším ředěním. Nutností je také vždy brát novou stříkačku s jehlou při každém ředění. Vždy se snažíme stříkačku z obalu rozbalit tak, aby zůstala sterilní.

Zkumavky musí být vždy označené, abychom věděli, o jaké ředění se jedná např. (1/1, 1/2, 1/3, ... což znamená první ředící řada/počet ředění).

Po vytvoření ředící řady byly připraveny a nadepsány Petriho misky. Z každé zkumavky ředící řady byl odebrán 0,5 ml média a přenesen do těchto připravených a popsaných Petriho misek. Médium bylo zalito agarem a vše se nechalo anaerobně kultivovat po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C.

Narostlé kolonie v Petriho miskách byly spočítány pomocí počítadla a celkový počet byl vynásoben číslem 2 (kvůli použití menších Petriho misek pro kultivaci a inokulační dávka je 0,5 ml a ne 1 ml). S každým vyšším ředěním by měl být počet kolonií cca 10x nižší. Výpočtem byly získány počty bakterií, tedy počet kolonie tvořících jednotek v 1 g vzorku stolice (KTJ/ 1g stolice) – viz vzorec pro výpočet.

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

P1, P2 – počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počítatelných plotnách

F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

KTJ – kolonie tvořící jednotka

Narostlé kolonie s rozdílnými kultivačními charakteristikami (tvar, struktura kolonie, barva) byly sterilně odebrány z Petriho misek bakteriologickou kličkou a byly vloženy do zkumavek s tekutým médiem WSP připraveným anaerobně. Tímto byl vytvořen izolát, který byl dále ponechán ke kultivaci při 37 °C po dobu 24 hodin.

Z narostlého izolátu bylo injekční stříkačkou odebráno malé množství média s narostlou kulturou na podložní sklíčko a přikryto krycím sklíčkem. Bylo sledováno ve světelném mikroskopu s fázovým kontrastem. Pro další identifikaci a testování bylo nutné mít pouze čisté kultury bifidobakterií (jednotné kultury nepravidelných tyčinek bez jakýchkoliv jiných mikroorganismů jako jsou například kvasinky, laktobacily, koky a další. Pozorování mikroskopem bylo uskutečněno při zvětšení 400x a každý preparát byl zdokumentován a archivován v podobě digitálního snímku.

Poté ze zkumavek bylo odebráno 0,5 ml média do nových zkumavek s médiem WSP. Tyto zkumavky byly opět řádně označeny. Bylo tak provedeno přeočkování izolátů. Pokud byla ve vzorku čistá kultura bifidobakterií, byl z každého vzorku odebrán 2x 1 ml média s narostlou kulturou do dvou sterilních zkumavek (1,5 ml; Eppendorf). Přičemž jedna zkumavka byla dále použita pro izolaci DNA, druhá pro identifikaci MALDI-TOF MS.

5.5 Izolace DNA

Zkumavky (Eppendorf) s 1 ml bakteriální suspenze byly centrifugovány v centrifuze, a to na dobu 3 minuty při nejvyšších otáčkách 14500 otáček za minutu. Následně byl ze zkumavek opatrně odlit supernatant a ponechán pouze sediment, který byl resuspendován 100 µl roztokem PrepMan Ultra (Thermo Fisher Scientific).

Suspenze byla v termobloku zahřáta po dobu 10 minut na 100 °C. Pak byla suspenze ponechána 2 minuty v pokojové teplotě. Následně proběhla opět centrifugace suspenze v centrifuze rychlostí 14500 otáček za minutu, a to po dobu 3 minut.

Po stočení bylo ze zkumavky odpipetováno 50 µl supernatantu do nové sterilní zkumavky (1,5 ml; Eppendorf). Izolovaná DNA byla následně uschovávána v mrazáku a byla připravena pro pozdější testování.

5.6 MALDI-TOF MS (extrakce pomocí ethanolu a kyseliny mravenčí)

Pro MALDI-TOF MS byl bakteriální sediment resuspendován 500 µl 70% ethanolu. Eppendorf zkumavky s 500 µl 70% ethanolu byly centrifugovány v centrifuze po dobu 3 minut při maximálním počtu otáček a následně byl odlit a odpipetován přebytečný ethanol, aby ve zkumavce zůstal pouze sediment. Sediment musí zůstat nepoškozen.

Poté bylo do zkumavek se sedimentem přidáno 25 µl 70% kyseliny mravenčí a 25 µl acetylnitridu.

Suspenze byla zvortexována (promíchána) a centrifugována v centrifuze. Následně byl ve dvou kopiích 1 µl napipetován na speciální destičku (Bruker). Nakonec byla na destičku přidána matrice a mezi dvě kopie byly rozděleny 2 µl. Tímto byly vzorky připraveny k identifikaci a vloženy do přístroje.

5.7 Test na detekci enzymu F6PPK

Převvedeme do centrifugačních zkumavek 3 ml narostlé kultury a dáme stočit. Stočené kultury slijeme a opláchneme v roztoku 1–250 µl. Pak přidáme 100 µl CTBA a kultivujeme 5 minut. Přidáme 62,5 µl roztoku 2 a 100 µl roztoku 7 a necháme 30 minut kultivovat ve vodní lázni při 37 °C. Následně přidáme 375 µl roztoku 3 a kultivujeme 10 minut. Na závěr přidáme 250 µl roztoku 4,5 a 6.

Pokud se zkumavky po přidání roztoku 6 zbarví do fialova, značí to přítomnost bifidobakterií. Nezabarvené zkumavky (žluté) bifidobakterie neobsahují.

Tabulka č. 4 – Složení použitých činidel

NÁZEV ČINIDLA	SLOŽENÍ
Roztok 1	0,36 g K ₂ HPO ₄ , 0,10 g KH ₂ PO ₄ , 0,15 g cysteinu, 300 ml H ₂ O
Roztok 2	120 mg NaF, 200 mg Na-iodoacetátu, 20 ml H ₂ O
Roztok 3	4,17 g hydroxylaminu, 30 ml H ₂ O (pH 6,5 – upravit 2 ml 40% NaOH)
Roztok 4	3 g TCA (trichloroctové kyseliny), 20 ml H ₂ O
Roztok 5	2,48 ml HCl, 17,52 ml H ₂ O
Roztok 6	1 g FeCl ₃ , 62 µl HCl, 20 ml H ₂ O
Roztok 7	290 mg fruktosa-6-fosfátu, 5,5 ml H ₂ O
CTAB	detergent cetrídium bromidu (45 mg/100 ml H ₂ O)

5.8 Identifikace získaných izolátů bifidobakterií

Výsledná identifikace izolátů byla provedena sekvenací genu 16S rRNA pracovníky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, a to Věrou Neužil Bunešovou a Nikol Modráčkovou. Z izolované DNA byla připravena polymerázová řetězová reakce (PCR) s použitím primerů (285F a 261R) pro 16S rRNA. Získaný PCR produkt byl zkontrolován a vizualizován pomocí gelové elektroforézy a následně purifikován. Purifikovaný produkt byl zaslán k sekvenování do GATC Biotech – nově Eurofins Genomics (Německo). Výsledky byly poté analyzovány

programy Chromas a BioEdit. Získaná sekvence byla porovnána s typovými sekvencemi uloženými v databázi Blast.

6 Výsledky

Rozbor byl proveden celkem u dvanácti vzorků primátů. Mezi těmito vzorky bylo 9 různých druhů – kosman zakrslý (Zoo Liberec), kosman běločelý (Zoo Olomouc), tamarín vousatý (Zoo Plzeň), tamarín žltoruký (Zoo Plzeň), šimpanz (Zoo Liberec), gibbon zlatolící (Zoo Olomouc, Zoo Bojnice), makak lví (Zoo Liberec), pavián pláštíkový (Zoo Liberec), a mangabej žltobřichý (Zoo Liberec). Pro stanovení počtu bakterií bylo využito kultivačních médií určených pro rod *Bifidobacterium*, a to médium BIF MUP a Bif-NORF, který je více selektivní. V tabulce níže jsou znázorněny stanovené počty detekovaných bakterií ze vzorků výkalů primátů. Výsledky jsou vyjádřeny logaritmem počtu kolonie tvořících jednotek v 1 g vzorku (log KTJ/g).

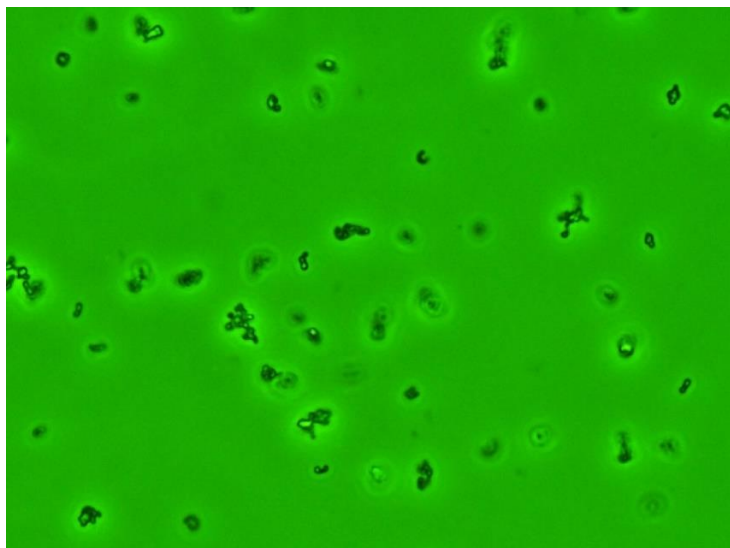
Tabulka č. 5 – Celkové počty a přesné počty bifidobakterií, získané ze vzorků výkalů primátů

ČÍSLO PRIMÁTA	CELKOVÉ POČTY (log KTJ/g)	BIF – MUP (log KTJ/g)	BIF – NORF (log KTJ/g)	IZOLÁTY
PR1	8,94	9,00	8,45	10
PR2	9,42	9,28	9,33	5
PR3	9,43	9,41	9,37	8
PR4	9,67	9,87	9,75	5
PR5	9,46	9,46	9,36	11
PR6	9,45	9,40	9,40	7
PR7	8,14	8,11	<10 ²	6
PR8	8,51	7,66	4,39	7
PR9	9,30	6,75	<10 ²	6
PR10	9,22	7,53	5,39	10
PR11	9,34	6,76	5,38	9
PR12	8,78	6,46	6,50	10

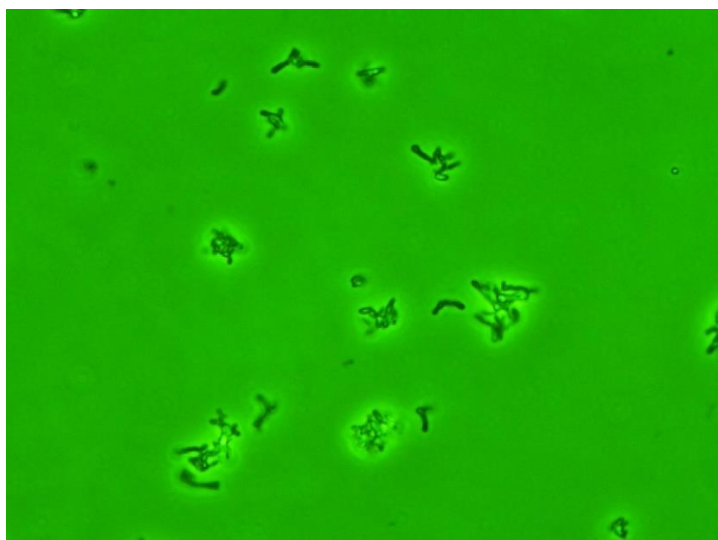
Bylo zjištěno, že celkový počet bakterií u zkoumaných druhů primátů se při kultivaci pohyboval v hodnotách od 8,14 do 9,67 log KTJ na 1 g stolice. Nejnížší celkové počty bakterií byly zaznamenány u lidoopů. Pro zjištění počtu bifidobakterií u vybraných vzorků bylo používáno médium BIF-MUP a BIF-NORF. Médium BIF-NORF je obohacené o norfloxacin a je více selektivní, tudíž byly očekávány menší počty bifidobakterií. Počet bifidobakterií při kultivaci na médiu BIF-MUP se pohyboval v rozmezí 6,46 – 9,87 log KTJ/g a na médiu BIF-NORF v rozmezí <10² – 9,75 log KTJ/g. Průměrná hodnota při použití kultivačního média BIF-MUP je 8,31 log KTJ/g a při použití kultivačního média BIF-NORF je 6,78 log KTJ/g. Nejnížší počet bifidobakterií na médiu BIF-NORF byl zjištěn u gibona zlatolícího ze zoo Bojnice a to <10² log KTJ/g. U tamarína vousatého z plzeňské zoo byl však zjištěn nejvyšší počet bifidobakterií a to 9,75 log KTJ/g. Přesné počty jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Jak již zde bylo zmíněno, médium BIF-NORF obohacené o norfloxacin je více selektivní. Při izolaci a identifikaci bifidobakterií byly častěji přítomny jiné mikroorganismy než bifidobakterie při využití média BIF-MUP. Průměrně byly počty na médiu BIF-MUP vyšší

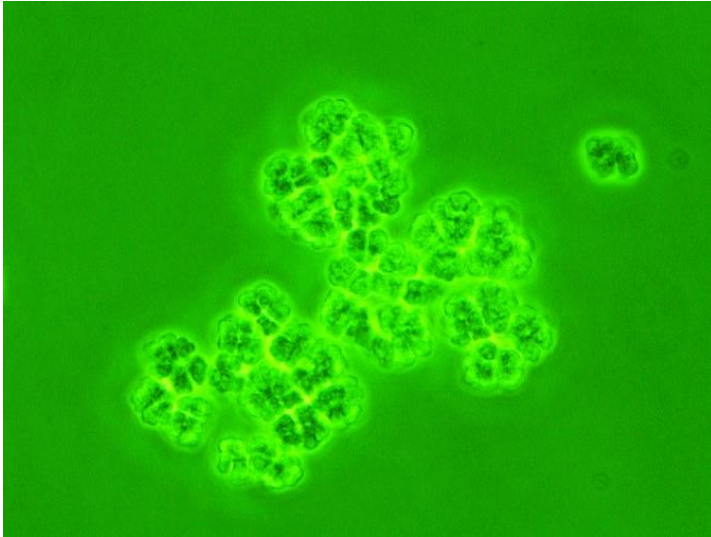
s porovnáním s počty na médiu BIF-NORF. Počet izolátů se pohyboval od 5 do 11, kvůli snaze získat co nejvaribilnější kolonie. Při izolaci byly tedy odebírány kultivačně zajímavé kolonie. Při kultivaci byly zaznamenány bakterie rodu *Clostridium* a *Sarciny*. Zmíněné rody tvoří plyn a při práci byl cítit zápach. Izoláty těchto rodů vykazovaly také odlišnou morfolonii pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Bifidobakterie vytvářely typické útvary nepravidelných tyčinek. Sarciny byly ve shlucích koků sarcinového uspořádání, které tvořily krychlové útvary a shlukovaly se. Klostridie byly ve formě typických pravidelných a silnějších tyčinek, které vytvářejí spóry.



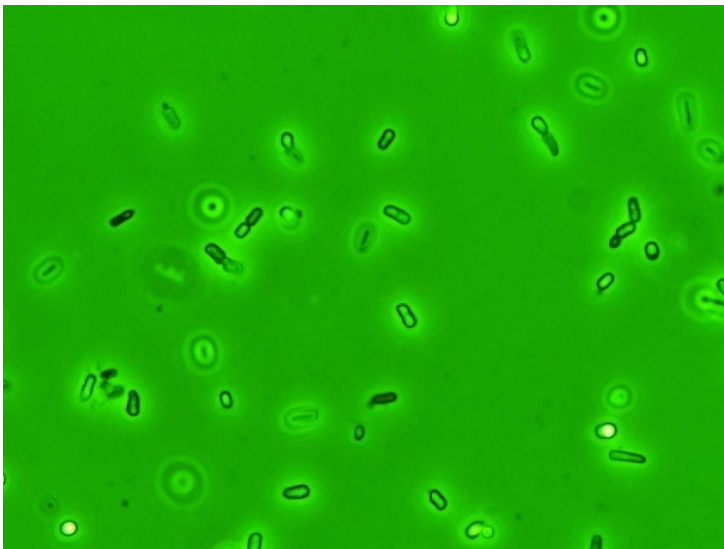
Obrázek č. 3 – *Bifidobacterium ramosum*



Obrázek č. 4 – *Bifidobacterium pseudocatenulatum*



Obrázek č. 5 – *Sarcina*



Obrázek č. 6 – *Clostridium*

S využitím testu na detekci enzymu F6PPK byla provedena identifikace bifidobakterií na rodovou úroveň. U všech vzorků primátů, kromě primáta číslo PR8 (gibon zlatolící), byly identifikovány bifidobakterie. U zmíněného gibona zlatolícího byl identifikován rod *Sarcina* a rod *Corynebacterium*. U některých vzorků byla pozorována kontaminace. Kompletní popis výsledků F6PPK testu je zapsán v tabulce číslo 6.

Tabulka č. 6 – Výsledky F6PPK testu

ČÍSLO PRIMÁTA	DRUH PRIMÁTA	F6PPK TEST +/-, MORFOLOGICKÁ IDENTIFIKACE
PR1	Kosman zakrslý	10/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR2	Kosman běločelý	5/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR3	Kosman běločelý	8/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR4	Tamarin vousatý	5/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR5	Tamarin žltoruký	11/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR6	Tamarin vousatý	7/2, rod <i>Bifidobacterium</i> , stafylokoky
PR7	Šimpanz	6/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR8	Gibon zlatolící	0/7, rod <i>Sarcina</i> , kyjovité tyčinky bakterií
PR9	Gibon zlatolící	2/4, rod <i>Bifidobacterium</i> , laktobacilly
PR10	Makak lví	10/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR11	Pavián pláštíkový	9/0, rod <i>Bifidobacterium</i>
PR12	Mangabej žltobřichý	10/0, rod <i>Bifidobacterium</i>

Pro přesnější identifikaci na úroveň druhu byla využita sekvenace genu 16S rRNA. Využita byla také metoda identifikace MALDI-TOF MS. Identifikace pomocí metody MALDI TOF MS není však tak přesná jako metoda sekvenace genu 16S rRNA a často se tedy stávalo, že se izoláty nezdařilo úspěšně identifikovat, jelikož dané druhy nebyly nalezeny v databázi.

Celkem 11 vzorků z 12 testovaných bylo pozitivních na přítomnost bifidobakterií. Jediný negativní vzorek (PR8) byl odebrán v olomoucké zoo od gibona zlatolícího. Bylo zjištěno, že bakterie rodu *Bifidobacterium* se vyskytovaly u všech devíti testovaných druhů primátů. A to u novosvětských druhů primátů: kosmana zakrslého, kosmana běločelého, tamarína vousatého, tamarína žltorukého, u lidoopů: gibona zlatolícího a šimpanze a u starosvětských primátů: makaka lvího, paviána pláštíkového a mangabeje žltobřichého.

Pomocí metody MALDI TOF MS se podařilo identifikovat jen menší množství druhů a to *B. dentium* u šimpanze (PR7), makaka lvího (PR10) a paviána pláštíkového (PR11), *B. adolescentis* u gibona zlatolícího (PR9), *B. pseudocatenulatum* u paviána pláštíkového (PR11) a *B. angulatum* u mangabeje žltobřichého (PR12).

Pro větší přesnost byla tedy použita sekvenace genu 16S rRNA a pomocí této metody byly u izolátů identifikovány druhy bifidobakterií jako *B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum*. V tomto případě se jedná o multi-hostitelské druhy. Jsou typické pro trávicí trakt člověka i dalších zvířecích hostitelů. Dále byl identifikován druh *B. adolescentis*, který je typický pro gastrointestinální trakt dospělého člověka a dalších zvířat, *B. dentium* a *Parascardovia denticolens* před reklasifikací *B. denticolens*, které se běžně nachází v zubním kazu. *P. denticolens* (*B. denticolens*) je zařazen do rodu *Parascardovia*, ale náleží do stejné čeledi jako bifidobakterie, a to do čeledi *Bifidobacteriaceae*.

U šimpanze (PR7), makaka lvího (PR10) a paviána pláštíkového (PR11) se podařilo izolovat *B. dentium*. U gibona zlatolícího (PR9) byl izolován druh *B. adolescentis*. U makaka lvího (PR10) se zdařila identifikace druhu *P. denticolens*. *B. pseudocatenulatum* se podařilo identifikovat u paviána pláštíkového (PR11). Poslední testovaný izolát (PR12) z výkalů mangabeje žltobřichého vykázal přítomnost *B. angulatum*.

Identifikovány byly však i druhy bifidobakterií, které jsou specifické pro novosvětské primáty, konkrétně *B. reuteri*, *B. tissieri*, *B. myosotis*, *B. callitrichos*, *B. aesculapii* a *B. ramosum*.

Mimo jiné se bohužel setkáváme s určitým stupněm kontaminace u velké části izolátů či neselektivního nárůstu na agaru pro bifidobakterie. Jednalo se například druh *Lactobacillus murinum* u gibona zlatolícího (PR9), který je pro svého hostitele přínosný. Dále pak byly izolovány druhy *Corynebacterium vitaeruminus* u gibona zlatolícího (PR8) a u šimpanze (PR7), a rod *Sarcina* opět u gibona zlatolícího (PR8). Podrobný soupis izolovaných druhů a využitých metod je v tabulce číslo 7.

Tabulka č. 7 – Identifikace izolátů bifidobakterií

ČÍSLO PRIMÁTA	DRUH PRIMÁTA	IDENTIFIKOVÁNO MALDI TOF MS JAKO:	SEKVENACE GENU PRO 16S rRNA IDENTIFIKOVÁNO JAKO:
PR1	Kosman zakrslý	NRI	<i>B. reuteri</i> (4), <i>B. tissieri</i> (4), <i>B. myosotis</i> (2)
PR2	Kosman běločelý	NRI	Nepodařilo se identifikovat, kontaminované
PR3	Kosman běločelý	NRI	<i>B. callitrichos</i> (3), <i>B. aesculapii</i> (2), <i>B. myosotis</i> (1), kontaminace (2)
PR4	Tamarín vousatý	NRI	<i>B. ramosum</i> (2), kontaminace (3)
PR5	Tamarín žltoruký	NRI	<i>B. callitrichos</i> (3), kontaminace (8)
PR6	Tamarín vousatý	NRI	Nepodařilo se identifikovat, vzorek pravděpodobně kontaminován – smíšená kultura obsahující <i>Staphylococcus epidermidis</i>
PR7	Šimpanz	<i>B. dentium</i> (4), NRI (2)	<i>B. dentium</i> (4), <i>Corynebacterium vitaeruminis</i> ^B (2)
PR8	Gibon zlatolící	NRI	Rod <i>Sarcina</i> ^A (5), <i>Corynebacterium vitaeruminis</i> (2)

PR9	Gibon zlatolící	<i>B. adolescentis</i> (2), <i>Lactobacillus murinum</i> (4)	<i>B. adolescentis</i> (1), <i>Lactobacillus murinum</i> (1), (4) ^C
PR10	Makak lví	<i>B. dentium</i> (6); NRI (4)	<i>B. dentium</i> (3), <i>Parascardovia</i> <i>denticolens</i> (1), kontaminace (3), nepoužito k identifikaci ^C (3)
PR11	Pavián pláštík	<i>B. pseudocatenulatum</i> (6); <i>B. dentium</i> (3)	<i>B. pseudocatenulatum</i> (5), <i>B. dentium</i> (1), nepoužito k identifikaci (3)
PR12	Mangabej žlutobřichý	<i>B. angulatum</i> (5), NRI (5)	<i>B. angulatum</i> (5), kontaminace (5)

NRI – not reliable identification = pomocí MALDI TOF MS se nepodařilo identifikovat

^A – sarciny byly identifikovány na základě morfologie

^B – identifikovány na základě morfologie a produkce plynu

^C – podobná morfologie tudíž sekvenovány jen vybrané izoláty

7 Diskuze

Trávicí trakt živočichů a lidí obsahuje komplex bakterií, virů, kvasinek a prvoků. Tento komplex nazýváme mikrobiotou, která hraje klíčovou roli ve zdraví hostitele (Tannock 1995). V mikrobiotě trávicího traktu panují rozdíly mezi druhy i mezi jednotlivci. Mikrobiota jako ekosystém obsahuje až 10^{14} bakterií (Ercolini et al. 2001; Walter 2008; Russell et al. 2011).

Rod *Bifidobacterium* se vyskytuje v různých ekologických nikách. Nejvíce z nich bylo identifikováno u zvířat, navíc jsou dominantní složkou mikrobioty savců v období mléčné výživy (Bunešová et al. 2014). Vyskytují se především v trávicím traktu teplokrevných živočichů a člověka. Byly nalezeny však i v lidské vagíně (Verhelst et al. 2005), lidské krvi (Hoyle et al. 2002), ve střevech čmeláka a včel (Killer et al. 2009; Killer et al. 2011), v mléčných potravinách a mase (Meile et al. 1997; Gavini et al. 2006; Delcenserie et al. 2007; Watanabe et al. 2009); v odpadních vodách (Scardovi et al. 1979; Biavati et al. 1982) a zubním kazu a plaku (Modesto et al. 2016).

Známé jsou také probiotické účinky bifidobakterií, které zlepšují trávení a zdraví hostitele, tudíž se bifidobakterie často přidávají do lidských potravin, ale i do krmiv pro zvířata (Felis & Dellaglio 2007). Poskytují hostiteli zdravotní výhody jako je například posílení střevní bariéry, modulace imunitního systému, či potlačení patogenních mikroorganismů produkcí antimikrobiálních látek, a konkurencí o živiny a vazebné místo na střevním epitelu (Marco et al. 2006).

Gastrointestinální trakt primátů je domovem bilionů bakterií a skladba mikrobioty se liší u primátů chovaných v zajetí a primátů žijících ve volné přírodě (Clayton et al. 2016). Gastrointestinální trakt primátů je spolu s lidmi a prasaty největší rezervoár biodiverzity bifidobakterií (Michellini et al. 2016). V posledních letech stoupá počet nově popsanych bifidobakteriálních druhů u primátů (Modesto et al. 2017; Modesto et al. 2018; Lugli et al. 2018).

Náplň této práce je zaměřena na výskyt bifidobakterií u primátů chovaných v zajetí v lidské péči v zoologických zahradách. Chovatele se snaží co nejvíce napodobit potravu se kterou se zvířata setkávají ve volné přírodě, bohužel stále i v současné době není biologie všech druhů primátů zcela známa a kvůli nedostatku informací o potravní ekologii určitých druhů, dochází k častým gastrointestinálním problémům (Power & Koutsos 2019). U zvířat žijících v lidské péči se často setkáváme s odlišnou mikrobiotou trávicího traktu, než je tomu u volně žijících zvířat. Pokud porovnáme potravu primátů, která je dostupná ve volné přírodě a potravu využívanou v lidské péči, je možno určit rozdíly v mikrobiotě trávicího traktu (McKenney et al. 2014; Clayton et al. 2016). Při chovu v lidské péči je nejčastější problém krmná dávka s vysokým obsahem sacharidů, anebo naopak nedostatek vlákniny, oproti dostupné potravě v přírodě (Goodchild et al. 2008; Kuhar et al. 2013). Zmíněný nadbytek sacharidů může působit na složení mikrobioty, ale i na chování jedince (Sbeglia et al. 2010; Britt et al. 2015).

Bylo testováno celkem 12 fekálních vzorků od 9 druhů primátů. Jednalo se o druhy kosman zakrslý, kosman běločelý, tamarin vousatý, tamarin žlutoruký, šimpanz, gibbon zlatolící, makak lví, pavián plástíkový a mangabej žlutobřichý. Vzorky pocházely z různých zoologických zahrad v rámci České republiky a Slovenska.

Bifidobakterie byly izolovány z gastrointestinálního traktu všech testovaných druhů primátů. Byly identifikovány multihostitelské druhy *B. dentium* u šimpanze, makaka lvího a

paviána pláštíkového, *B. adolescentis* u gibona zlatolícího, *Parascardovia denticolens* (dříve *B. denticolens*) u makaka lvího, *B. pseudocatenulatum* u paviána pláštíkového, *B. angulatum* u mangabeje žlutobřichého. Nomoto et al. (2017) izolovali u šimpanze, který byl chová v zajetí, druhy *B. pseudolongum* a *B. pseudocatenulatum*. Nám se u šimpanze z liberecké zoo povedlo izolovat druh *B. dentium*. Další skupinou izolovaných bifidobakterií byly druhy dříve izolované z fekálních vzorků novosvětských primátů, tedy specifické pro tuto skupinu primátů. Konkrétně se jednalo o *B. reuteri* u kosmana zakrslého, *B. tissieri* u kosmana zakrslého, *B. myosotis* u kosmana zakrslého a u kosmana běločelého, *B. callitrichos* u kosmana běločelého a tamarína žltorukého, *B. aesculapii* u kosmana běločelého, *B. ramosum* u tamarína vousatého. V uplynulých dvou letech byly objeveny nové druhy právě především u novosvětských primátů. Z výkalů dospělého tamarína vousatého bylo izolováno *B. callitrichidarum* (Modesto et al. 2017). Druhy *B. primatium*, *B. scaligerum*, *B. felsineum* byly izolovány z výkalů dospělce tamarína pinčího (*Saguinus oedipus*) a *B. simiarum* z výkalů dospělého tamarína vousatého (*Saguinus imperator*) (Modesto et al. 2018). Lugli et al. (2018) izolovali *B. margollesii*, *B. parmae* u kosmana zakrslého (*Callithrix pygmaea*) a *B. imperatoris* u tamarína vousatého (*Saguinus imperator*). Žádný z těchto nově popsáných druhů se nepodařilo izolovat. Podařilo se však izolovat druhy, které byly popsány v roce 2016 a to *B. tissieri* a *B. myosotis*. Tyto dva druhy (*B. tissieri*, *B. myosotis*) byly původně izolovány z výkalů mláděta kosmana bělovousého (Michelini et al. 2016). Nám se podařilo izolovat *B. tissieri* u kosmana zakrslého a *B. myosotis* u kosmana zakrslého a u kosmana běločelého. V roce 2016 byl také izolován druh *B. ramosum* z výkalů tamarína pinčího (Michelini et al. 2016). My jsme izolovali tento druh z výkalů tamarína vousatého. Ve většině zoo jsou novosvětské opice ve společném pavilonu a někdy i pohromadě, tudíž může docházet k přenosu bifidobakterií mezi jedinci i druhy. Je známo to, že i lidé dokáží sdílet mikrobiotu mezi sebou, ale i se svými psy (Song et al. 2013).

Druhy *B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum*, *B. dentium* a *B. adolescentis* které byly izolovány u starosvětských druhů primátů, jsou typické pro gastrointestinální trakt člověka, ale vyskytují se i u jiných živočichů (Scardovi & Crociani 1974; Belenguer et al. 2006; Cano et al. 2013). *B. dentium* a *P. denticolens* (*B. denticolens*) se vyskytují v lidské ústní dutině a byly izolovány z lidských zubních kazů (Modesto et al. 2006; Oshima et al. 2015).

Velmi zajímavé je, že multi-hostitelské druhy se objevovaly u starosvětských primátů včetně lidoopů, za to u všech novosvětských primátů byly izolovány druhy pravděpodobně hostitelsky specifické pro tuto skupinu opic.

V bakalářské práci bylo využito kultivační stanovení na selektivních agarech. Bylo použito médium BIF-MUP a BIF-NORF, který je více selektivní. Jednalo se o modifikovaný WilkinsChalgren agar s přidávkem sojového peptonu, cysteinu, tweenu. V případě BIF-MUP byl agar doplněn o antibiotikum mupirocin a ledovou kyselinu octovou, a u varianty BIF-NORF byl k výše uvedenému přidán ještě norfloxacin. Vyšší počty bifidobakterií byly detekované dle očekávání na médiu BIF-MUP. Médium BIF-NORF skutečně prokázalo vyšší selektivitu. Také bylo zajímavým zjištěním, že bifidobakterie byly detekovány u novosvětských primátů v počtech 10^9 a jednalo se o počty podobné hodnotám zjištěným na agaru pro celkové počty anaerobů. Nicméně u starosvětských primátů a lidoopů byly počty detekovaných bifidobakterií poloviční v průměru 10^4 .

I přesto, že je médium obohacené o norfloxacin více selektivní (Vlková et al. 2015), při kultivaci se objevil nárůst jiných rodů bakterií. Jednalo se především o bakterie z čeledi

Clostridiaceae, konkrétně rod *Sarcina* a rod *Clostridium*. Rod *Sarcina* se přirozeně vyskytuje v půdě, blátě a obilných zrnech. Je považován jako potenciálně patogenní, pokud je nalezen v trávicím traktu. Jeho patogenita však není zcela jistá, jelikož se vyskytuje v trávicím traktu i u zdravých jedinců, kteří netrpí žádnými problémy (Bunešová et al. 2016). Rod *Clostridium* je patogenní a některé druhy tvoří enterotoxiny. Do trávicího traktu živočichů se dostávají kontaminovanou potravou (Songer 2010). Tyto dva rody byly znatelné již při pohledu pouhým okem díky mikroskopické morfologii a také kvůli značné produkci plynů. Bifidobakterie však svou přítomností počty těchto bakterií snižovaly. Dalším izolovaným druhem byla bakterie *Corynebacterium vitaeruminis*. Jedná se o bezpečný a nepatogenní druh (Al-Dilaimi et al. 2014).

8 Závěr

Domnívali jsme se, že v trávicím traktu primátů chovaných v zoologických zahradách budou dominovat spíše multi-hostitelské druhy bifidobakterií, a tato domněnka nebyla zcela potvrzena. U starosvětských primátů včetně lidoopů pomocí F6PPK testu, MALDI TOF MS a sekvenace genu pro 16S rRNA se nám podařilo identifikovat spíše multi-hostitelské druhy, a to *B. pseudocatenulatum*, *B. angulatum*, *B. adolescentis*, *B. dentium* a také *Parascardovia denticolens* (dříve *B. denticolens*). U novosvětských druhů primátů byly izolovány druhy pravděpodobně hostitelsky specifické pro tuto skupinu primátů, konkrétně druhy *B. reuteri*, *B. tissieri*, *B. myosotis*, *B. callitrichos*, *B. aesculapii* a *B. ramosum*. U všech devíti testovaných druhů primátů byla potvrzena přítomnost rodu *Bifidobacterium*. Jeden primátí fekální vzorek byl však na přítomnost bifidobakterií negativní, a to gibona zlatolícího z olomoucké zoo. Jiný gibbon zlatolící, který je chován v zoologické zahradě ve slovenské Bojnici, ve svém trávicím traktu bifidobakterie však přítomné měl a to druh *B. adolescentis*.

Zajímavým zjištěním bylo též, že u novosvětských primátů jsou bifidobakterie dominantní skupinou kultivovatelných anaerobů, ale u starosvětských opic a lidoopů jsou počty zhruba poloviční.

Bifidobakterie jsou v současné době velmi zajímavým tématem pro řadu studií, a to nejen u primátů, ale i u lidí. Tato práce byla zaměřena na porovnání výskytu bifidobakterií v trávicím traktu u volně žijících primátů a u primátů chovaných v zajetí. V posledních letech bylo u primátů identifikováno spousta nových druhů, tudíž by bylo určitě velmi přínosné zaměřit se na identifikování dalších nových druhů a na jejich popsání.

9 Literatura

- Abu-Tarboush HM, Al-Saiady MY, Keir El-Din AH. 1996. Evaluation of diet containing Lactobacilli on performance, fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Animal Feed Science and Technology* **57**:39-49.
- Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Modesto MM, Biavati B, Di Gioia D. 2019. *Bifidobacterium xylocopae* sp. nov. and *Bifidobacterium aemilianum* sp. nov., from the carpenter bee (*Xylocopa violacea*) digestive tract. *Systematic and applied microbiology* **42**:205-216.
- Al-Dilaimi A, Albersmeier A, Kalinowski J, Rückert C. 2014. Complete genome sequence of *Corynebacterium vitaeruminis* DSM 20294 T, isolated from the cow rumen as a vitamin B producer. *Journal of Biotechnology* **189**:70–71.
- Alexander RM. 1993. The relative merits of foregut and hindgut fermentation. *Journal of Zoology* **231**:391–401.
- Amato KR et al. 2013. Habitat degradation impacts primate gastrointestinal microbiomes. *ISME Journal* **7**:1344–1353.
- Amato KR et al. 2016. Using the gut microbiota as a novel tool for examining colobine primate GI health. *Global ecology and conservation* **7**:225-237.
- Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia D, Santini C, Mogna L, Biavati B. 2012. A *Bifidobacterium*-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. *International journal of food microbiology* **157**:156-161.
- Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, Flint HJ. 2006. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3593-3599.
- Berkovitz B, Shellis P. 2018. Chapter 9 – Primates. Page(s) 149-178 in Berkovitz B, Shellis P, editors. *The Teeth of Mammalian Vertebrates*. Academic Press, Cambridge.
- Biavati B, Mattarelli P. 2012. Genus I. *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472AL. Page(s) 171-224 in De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg N, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 5. The Actinobacteria, Part A. Springer, New York.
- Biavati B, Scardovi V, Moore WEC. 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of 4 new species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **32**:358-373.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. *Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications*. *Annals of microbiology* **50**:117-131.
- Bjorkholm B, Bok CM, Lundin A, Rafter J, Hibberd ML, Pettersson S. 2009. Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. *PLoS One* **4** (e6958) DOI: 10.1371/journal.pone.0006958.

- Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**:516–520.
- Blaxter KL. 1962 *The Energy Metabolism of Ruminants*. Hutchinson and Co, London.
- Blum S, Schiffrin EJ. 2003. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria? *Current Issues in Intestinal Microbiology* **4**:53–60.
- Britt S, Cowlard K, Baker K, Plowman A. 2015. Aggression and self-directed behaviour of captive lemurs (*Lemur catta*, *Varecia variegata*, *V. rubra* and *Eulemur coronatus*) is reduced by feeding fruit-free diets. *Journal of Zoo and Aquarium Research* **3**:52-58.
- Bruorton MR, Davis CL, Perrin MR. 1991. Gut microflora of vervet and samango monkeys in relation to diet. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:573-578.
- Bruorton MR, Perrin MR. 1991. Comparative gut morphometrics of Vervet (*Cercopithecus aethiops*) and Samango (*C. mitis erythrarchus*) monkeys. *Zeitschrift für Säugetierkunde* **56**:65-71.
- Bryant MP. 1978. Cellulose digesting bacteria from human feces. *The American journal of clinical nutrition* **31**:113-115.
- Bunešová V, Domig KJ, Killer J, Vlková E, Kopečný J, Mrázek J, Ročková S, Rada V. 2012. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* **18**:166-168.
- Bunešová V, Drnková B, Vlková E. 2016. Opportunistic pathogen *Sarcina ventriculi*. *Medicína pro praxi* **13**:64-67.
- Bunešová V, Joch M, Musilová S, Rada V. 2017. Bifidobacteria, Lactobacilli, and Short Chain Fatty Acids of Vegetarians and Omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica* **48**:47-54.
- Bunesova V, Killer J, Javurkova B, Vlkova E, Tejnecky V, Musilova S, Rada V. 2017. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *Anaerobe* **44**:40-47.
- Bunesova V, Lacroix C, Schwab C. 2018. Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii*. *Microbial Ecology* **75**:228-238.
- Bunešová V, Vlkova E, Killer J, Rada V, Rockova S. 2012. Identification of Bifidobacterium strains from faeces of lambs. *Small Ruminant Research* **105**:355-360.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Killer J, Musilová S. 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: Differences and similarities. *Beneficial Microbes* **5**:377-388.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Killer J, Kmet V. 2013. Identification of bifidobacteria isolated from Asian elephant (*Elephas maximus*). *Journal of Biosciences* **38**:239-243.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Rocková S, Svobodová I, Jebavý L, Kmet V. 2012. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains isolated from dog faeces. *Veterinary Microbiology* **160**:501-505.

- Bunthof CJ, Abee T. 2002. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:2934-2942.
- Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. 2013 *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet fed mice. *Obesity (Silver Spring)* **21**:2310–21.
- Caton JM. 1998. The morphology of the gastrointestinal tract of *Pygathrix nemaeus* (Linnaeus, 1771). Page(s) 129-152 in Jablonski NG, editor. *The Natural History of the Doucs and Snub-Nosed Monkeys*. World Scientific, New Jersey.
- Clayton JB et al. 2016. Captivity humanizes the primate microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**:10376-10381.
- Clemens ET. 1980. The digestive tract: insectivore, prosimian, and advanced primate. Pages 90-99 in Schmidt-Nielsen K, Bolis L, Taylor CR, editors. *Comparative Physiology: Primitive Mammals*. Cambridge University Press, New York.
- Clemens ET, Phillips B. 1980. Organic acid production and digesta movement in the gastrointestinal tract of the baboon and sykes monkey. *Comparative Biochemistry and Physiology* **66**:529-532.
- Cronin M, Ventura M, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**:4-18.
- Davenport HW. 1978. *A Digest of Digestion*. Year Book Medical Publishers, Chicago.
- Delcenserie V, Gavini F, Beerens H, Tresse O, Franssen C, Daube G. 2007. Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **30**:381-389.
- Delcenserie V, Taminiau B, Gavini F, de Schaetzen MA, Cleenwerck I, Theves M, Mahieu M, Daube G. 2013. Detection and characterization of *Bifidobacterium crudilactis* and *B. mongoliense* able to grow during the manufacturing process of French raw milk cheeses. *BMC Microbiology* **13**:239.
- Delroisse JM, Boulvin AL, Parmentier I, Dauphin RD, Vandebol M, Portetelle D. 2008. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiological Research* **163**:663-670.
- Dong XZ, Xin YH, Jian WY, Liu XL, Ling DW. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**:119-125.
- Dumas ME, et al. 2006. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:12511–12516.
- Dunne C et al. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**:386–392.

- Duranti S, Mangifesta M, Lugli GA, Turrone F, Anzalone R, Milani C, Mancabelli L, Ossiprandi MC, Ventura M. 2017. *Bifidobacterium vansinderenii* sp. nov., isolated from faeces of emperor tamarin (*Saguinus imperator*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **67**:3987-3995.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Schumann P, Pukall R, Dicks LM. 2012. *Bifidobacterium reuteri* sp. nov., *Bifidobacterium callitrichos* sp. nov., *Bifidobacterium saguini* sp. nov., *Bifidobacterium stellenboschense* sp. nov. and *Bifidobacterium biavatii* sp. nov. isolated from faeces of common marmoset (*Callithrix jacchus*) and red-handed tamarin (*Saguinus midas*). *Systematic and applied microbiology* **35**:92-97.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* **24**:610-617.
- FAO/WHO. 2001. Joint Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Felis GE, Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **8**:44-61.
- Ferraris L, Aires J, Waligora-Dupriet AJ, Butel MJ. 2010. New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces. *Anaerobe* **16**:469-471.
- Fijan S. 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health* **11**:4745-4767.
- Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. 1983. Normal Indigenous Intestinal Flora. Page(s) 3-31 in Hentges DJ, editor. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press, New York.
- Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature* **6**:121-131.
- Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* **3**:289-306.
- Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* **141**:15-28.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition. Springer-Verlag, New York.
- Gavini F, Delcenserie V, Kopeinig K, Pollinger S, Beerens H, Bonaparte C, Upmann M. 2006. *Bifidobacterium* species isolated from animal feces and from beef and pork meat. *Journal of Food Protection* **69**:871-877.
- Gavini F, Pourcher AM, Neut C, Monget D, Romond C, Oger C, Izard D. 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**:548-557.

- Gibson GR. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements* **1**:25-31.
- Gibson GR, Wang X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied bacteriology* **77**:412-420.
- Goodchild S, Schwitzer CH. 2008. The problem of obesity in captive lemurs. *International Zoo News* **55**:353-357.
- Groves CP, Napier JR. 2018. Primate - Mammal. *Encyclopaedia Britannica*. (Available from <https://www.britannica.com/animal/primate-mammal/Introduction> (accessed February 2019)).
- Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. 2000. Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **31**:453-457.
- Hill C, et al. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **11**:506-514.
- Hill WCO. 1958. Pharynx, oesophagus, stomach, small and large intestine: Form and position. *Primatologia* **3**:139-207.
- Hladik CM, Charles-Dominique P. 1974. The behaviour and ecology of sportive lemur (*Lepilemur mustelinus*) in relation to its dietary peculiarities. Pages 23-37 in Martin RD, Doyle GA, Walker AC, editors. *Prosimian Biology*. Duckworth, London.
- Horowitz MI. 1967. Mucopolysaccharides and glycoproteins of the alimentary tract. *Handbook of Physiology* **11**:1063.
- Hoyles L, Inganas E, Falsen E, Drancourt M, Weiss N, McCartney AL, Collins MD. 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp nov., from human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:995-999.
- Chaucheyras-Durand F, Durand H. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* **1**:3-9.
- Chivers DJ, Hladik CM. 1980. Morphology of the gastrointestinal tract in primates: Comparisons with other mammals in relation to diet. *Journal of Morphology* **16**:337-386.
- Islam SU. 2016. Clinical uses of probiotics. *Medicine* **95**:1-5.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. 2004. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**:299-313.
- Iwasaki H, Araki Y, Ito E, Nagaoka M, Yokokura T. 1990. Structure of macroamphiphiles from several Bifidobacterium strains. *Journal of Bacteriology* **172**:845-852.
- Izawa K. 1975. Foods and feeding behavior of monkeys in the upper Amazon basin. *Primates* **16**:295-316.
- Jacobsen N. 1970. Salivary amylase. II: Alpha amylase in salivary glands of the *Macaca irus* monkey, the *Cercopithecus aethiops* monkey, and man. *Caries Research* **4**:200-205.

- Karasov WH, Diamond JM. 1988. Interplay between physiology and ecology in digestion. *BioScience* **38**:602-611.
- Kawasaki S, Mimura T, Satoh T, Takeda K, Niimura Y. 2006. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:6854-6858.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Koppová I, Havlík J, Benada O, Kott T. 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **61**:1315-1321.
- Killer J, Kopečný J, Mrázek J, Rada V, Benada O, Koppová I, Havlík J, Straka J. 2009. *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**:2020-2024.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunešová V, Vlčková E. 2018. The threonine-tRNA ligase gene region is applicable in classification, typing, and phylogenetic analysis of bifidobacteria. *Journal of Microbiology* **56**:713-72.
- Killer J, Marounek M. 2011. Fermentation of mucin by bifidobacteria from rectal samples of humans and rectal and intestinal samples of animals. *Folia Microbiologica* **56**:85-89.
- Kondepudi KK, Ambalam P, Nilsson I, Wadström T, Ljungh Å. 2012. Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Anaerobe* **18**:489-497.
- Kuhar CW, Fuller GA, Dennis PM. 2013. A survey of diabetes prevalence in zoo-housed primates. *Zoo biology* **32**:63-69.
- Langer P. 1988. *The Mammalian Herbivore Stomach: Comparative Anatomy, Function and Evolution*. Gustav Fischer Verlag, New York.
- Lauer E, Kandler O. 1983. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology* **4**:42-64.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1303-1315.
- Ley RE, et al. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**:1647-1651.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**:1022–1023.
- Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**:747–748.
- Lim YM, Barnes MB, Gras SL, McSweeney C, Lockett T, Augustin MA, Gooley PR. 2014. Esterification of high amylose starch with short chain fatty acids modulates degradation by *Bifidobacterium* spp. *Journal of Functional Foods* **6**:137-146.
- Lugli GA et al. 2018. Phylogenetic classification of six novel species belonging to the genus *Bifidobacterium* comprising *Bifidobacterium anseris* sp. nov., *Bifidobacterium criceti* sp.

- nov., *Bifidobacterium imperatoris* sp. nov., *Bifidobacterium italicum* sp. nov., *Bifidobacterium margollesii* sp. nov. and *Bifidobacterium parmae* sp. nov. Systematic and applied mikrobiology **41**:173-183.
- Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. Current Opinion in Biotechnology **17**:204-210.
- Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. 2007. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. Journal of Proteome Research **6**:546–551.
- Marshall B. 2003. *Helicobacter pylori*: past, present and future. The Keio Journal of Medicine **52**:80–85.
- Martin GR, Beck PL, Sigalet DL. 2006. Gut hormones, and short bowel syndrome: the enigmatic role of glucagon-like peptide-2 in the regulation of intestinal adaptation. World Journal of Gastroenterology **12**:4117–4129.
- Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. International Journal of Food Microbiology **93**:109-113.
- Mayer M, Abenthum A, Matthes JM, Kleeberger D, Ege MJ, Hölzel C, Bauer J, Schwaiger K. 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. Veterinary Microbiology **161**:179-185.
- Mayer HK, Amtmann E, Philippi E, Steinegger G, Mayrhofer S, Kneifel W. 2007. Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. International Dairy Journal **17**:565-573.
- McKenney EA, Ashwell M, Lambert JE, Fellner V. 2014. Fecal microbial diversity and putative function in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*), common chimpanzees (*Pan troglodytes*), Hamadryas baboons (*Papio hamadryas*) and binturongs (*Arctictis binturong*). Integrative zoology **9**:557-569.
- Meile L, Ludwig W, Rueger U, Gut C, Kaufmann P, Dasen G, Wenger S, Teuber M. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. Systematic and Applied Microbiology **20**:57-64.
- Michelini S. 2016. Bifidobacteria ecology of non-human primates: characterization of novel species with unexpected functionalities for probiotic applications and a co-evolutionary host-microbe analysis [PhD Thesis]. University of Bologna, Bologna.
- Michelini S, Modesto M, Filippini G, Spiezio C, Sandri C, Biavati B, Pisi A, Mattarelli P. 2016. *Bifidobacterium aerophilum* sp. nov., *Bifidobacterium avesanii* sp. nov. and *Bifidobacterium ramosum* sp. nov.: three novel taxa from the faeces of cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus* L.). Systematic and applied mikrobiology **39**:229-236.
- Michelini S, Modesto M, Pisi AM, Filippini G, Sandri C, Spiezio, C., Biavati B, Sgorbati B, Mattarelli P. 2016. *Bifidobacterium eulemuris* sp. nov., isolated from faeces of black lemurs (*Eulemur macaco*). International journal of systematic and evolutionary microbiology **66**:1567-1576.

- Michelini S, Oki K, Yanokura E, Shimakawa Y, Modesto M, Mattarelli P, Biavati B, Watanabe K. 2016. *Bifidobacterium myosotis* sp. nov., *Bifidobacterium tissieri* sp. nov. and *Bifidobacterium hapali* sp. nov., isolated from faeces of baby common marmosets (*Callithrix jacchus* L.). International journal of systematic and evolutionary microbiology **66**:255-265.
- Milton K. 1986. Digestive physiology in primates. Physiology **1**:76-79.
- Milton K. 1993. Diet and primate evolution. Scientific American **269**:86-93.
- Milton K, McBee RH. 1983. Rates of fermentative digestion in the howler monkey *Alouatta palliata* (Primates: Cebidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **74**:29-31.
- Mitsuoka T. 1984. Taxonomy and Ecology of Bifidobacteria. Bifidobacteria Microflora **3**:11-28.
- Mitsuoka T. 1992. The human gastrointestinal tract. Page(s) 69-114 in Wood BJ, editor. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. 2006. Occurrence of the family *Bifidobacteriaceae* in human dental caries and plaque. Caries Research **40**:271-276.
- Modesto M, et al. 2017. *Bifidobacterium callitrichidarum* sp. nov. from the faeces of the emperor tamarin (*Saguinus imperator*). International journal of systematic and evolutionary microbiology **68**:141-148.
- Modesto M, Michelini S, Oki K, Biavati B, Watanabe K, Mattarelli P. 2018. *Bifidobacterium catulorum* sp. nov., a novel taxon from the faeces of the baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). International journal of systematic and evolutionary microbiology **68**:575-581.
- Modesto M, Michelini S, Stefanini I, Ferrara A, Tacconi S, Biavati B, Mattarelli P. 2014. *Bifidobacterium aesculapii* sp. nov., from the faeces of the baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). International journal of systematic and evolutionary microbiology **64**:2819-2827.
- Modesto M, Michelini S, Stefanini I, Sandri C, Spiezio C, Pisi A, Filippini G, Biavati B, Mattarelli P. 2015. *Bifidobacterium lemurum* sp. nov., from faeces of the ring-tailed lemur (*Lemur catta*). International journal of systematic and evolutionary microbiology, **65**:1726-1734.
- Modesto M, Puglisi E, Bonetti A, Michelini S, Spiezio C, Sandri C, Sgorbati B, Morelli L, Mattarelli P. 2018. *Bifidobacterium primatium* sp. nov., *Bifidobacterium scaligerum* sp. nov., *Bifidobacterium felsineum* sp. nov. and *Bifidobacterium simiarum* sp. nov.: Four novel taxa isolated from the faeces of the cotton top tamarin (*Saguinus oedipus*) and the emperor tamarin (*Saguinus imperator*). Systematic and applied mikrobiology **41**:593-603.
- Moeller AH, Peeters M, Ndjango JB, Li Y, Hahn BH, Ochman H. 2013. Sympatric chimpanzees and gorillas harbor convergent gut microbial communities. Genome Research **23**:1715-1720.

- Moore J. 2004. The use of probiotics in the calf: an overview. *Cattle Practice* **12**:125-128.
- Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry science* **86**:309-317.
- Mrázek J, Štrosová L, Fliegerová K, Kott T, Kopečný J. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica* **53**:229-233.
- Murray P. 1975. The role of cheek pouches in cercopithecine monkey adaptive strategy. Page(s) 151-194 in Tuttle RH, editor. *Primate Functional Morphology and Evolution*. Mouton Publishers, Paris.
- Musilova S, Modrackova N, Hermanova P, Hudcovic T, Svejstil R, Rada V, Tejnecky V, Bunesova V. 2017. Assessment of the synbiotic properties of human milk oligosaccharides and *B. longum* subsp. *infantis* in vitro and in humanised mice. *Beneficial Microbes* **8**:281-289.
- Myers P. 2000. Primates. Animal Diversity Web. Available from <http://animaldiversity.org/accounts/Primates/> (accessed February 2019).
- Myers P, Espinosa R, Parr CS, Jones T, Hammond GS, Dewey TA. 2019. Primates. The Animal Diversity Web. Available from <https://animaldiversity.org/accounts/Primates/classification/#Primates> (accessed February 2019)
- National Research Council. 2003. Nutrient requirements of nonhuman primates. National Academies Press, Washington, D.C.
- Neish AS. 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* **136**:65–80.
- Oshima K, Hayashi JI, Toh H, Nakano A, Shindo C, Komiya K, Morita H, Honda K, Hattori M. 2015. Complete genome sequence of *Parascardovia denticolens* JCM 12538^T, isolated from human dental caries. *Genome Announc.* 3(e00485-15) DOI: 10.1128/genomeA.00485-15.
- Op den Camp HJM, Oosterhof A, Veerkamp JH. 1985. Cell surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum*. *Antoine Van Leeuwenhoek* **51**:303-312.
- Ouwehand AC. 2007. Antiallergic effects of probiotics. *The Journal of Nutrition* **137**:794–797.
- Parra R. 1978. Comparison of foregut and hindgut fermentation in herbivores. Page(s) 205-229 in Montgomery GG, editor. *The Ecology of Arboreal Folivores*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Pereira DI, Gibson GR. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:4689–4693.

- Pereira DI, Gibson GR. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **37**:259–281.
- Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:179–185.
- Power ML, Koutsos L. 2019. Chapter 4 – Marmoset Nutrition and Dietary Husbandry. Page(s) 63-76 in Fox JG, Marini RP, Wachtman LM, Tardif SD, Mansfield K, editors. *The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research*. Academic Press, Cambridge.
- Rada V. 2011. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Medicína pro praxi* **8**:10-15.
- Rada V, Koc J. 2000. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft* **55**:65-67.
- Rada V, Petr J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods* **43**:127-132.
- Rada V, Petr J. 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Veterinarni Medicina* **47**:1-4.
- Rahaman H, Srihari K, Krishnamoorthy RV. 1975. Polysaccharide digestion in cheek pouches of the Bonnet Macaque. *Primates* **16**:175-180.
- Rašić JL, Kurmann JA. 1983. Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. *Experientia*. **39**:175.
- Richard AF. 1985. *Primates in Nature*. WH Freeman and Company, New York.
- Ripamonti B et al. 2011. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe* **17**:97-105.
- Roy D, Mainville I, Mondou F. 1997. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *International Dairy Journal* **7**:785-793.
- 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* **191**:17-24.
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**:88-105.
- Sakaguchi E, Suzuki K, Kotera S, Ehara A. 1991. Fibre digestion and digesta retention time in macaque and colobus monkeys. Pages 671-674 in Ehara A, Kuimura T, Takenaka O, Iwamoto M, editors. *Primate Today: Proceedings of the 13th Congress International Primatology Society*. Elsevier Science Publishing, Amsterdam.
- Salminen SJ, Gueimonde M, Isolauri E. 2005. Probiotics that modify disease risk. *The Journal of Nutrition* **135**:1294–1298.

- Sanchez B, Ruiz L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P, Margolles A. 2013. Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological Research* **69**:127-136.
- Sartor RB. 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**:1620–1633.
- Satokari RM, Vaughan EE, Smidt H, Saarela M, Mättö J, De Vos WM. 2003. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology* **26**:572-584.
- Sbeglia GC, Tang-Martinez Z, Sussman RW. 2010. Effects of food, proximity, and kinship on social behavior in ringtailed lemurs. *American Journal of Primatology* **72**:981-991.
- Scardovi V, Trovatelli LD, Biavati B, Zani G. 1979. *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* – 4 new species and their deoxyribonucleic-acid homology relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology* **29**:291-311.
- Scardovi V, Crociani F. 1974. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **24**:6-20.
- Sela DA et al. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:18964–18969.
- Sgorbati B, Biavati B, Palenzona D. 1995. The genus *Bifidobacterium*. Page(s) 279-306 in Wood BJB, Holzappel WH, editors. *The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria*, vol 2. Springer, Boston.
- Shah NP. 1997. Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented milk products. *Milchwissenschaft* **52**:16-21.
- Sharon N. 1980. Carbohydrates. *Scientific American* **243**:90–116.
- Shim SB, Verstegen MWA, Kim IH, Kwon OS, Verdonk J. 2005. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition* **59**:419-427.
- Schell MA et al. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:14422–14427.
- Schmidt-Nielson K. 1997. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Siggers RH, Thyman T, Siggers JL, Schmidt M, Hansen AK, Sangild PT. 2007. Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate. *Livestock Science* **109**:14-18.

- Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI. 2002. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial Ecology* **44**:186-197.
- Simpson PJ, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp nov., isolated from a *porcine caecum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:401-406.
- Song SJ et al. 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife* 2 (e00458) DOI: 10.7554/eLife.00458.
- Songer JG. 2010. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology* **140**:399-404.
- Stevens CE, Hume ID. 1995. *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*, second edition. Cambridge University Press, New York.
- Stewart CB, Schilling JW, Wilson AC. 1987. Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature* **330**:401-404.
- Strompfová V, Lauková A. 2014. Isolation and characterization of faecal bifidobacteria and lactobacilli isolated from dogs and primates. *Anaerobe* **29**:108-112.
- Takada T, Matsumoto K, Nomoto K. 2004. Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *Journal of Microbiological Methods* **58**:413-421.
- Tamime AY, Marshall VME, Robinson RK. 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Research* **62**:151-187.
- Tannock GW. 1995. *Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body*. Chapman & Hall, London.
- Temmerman R, Huys G, Swings J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology* **15**:348-359.
- Tortora GJ, Anagnostakos NP. 1987. *Principles of Physiology*. Harper and Row, Cambridge.
- Tsuchida S, Takahashi S, Nguema PPM, Fujita S, Kitahara M, Yamagiwa J, Ngomanda A, Ohkuma M, Ushida K. 2014. *Bifidobacterium moukalabense* sp. nov., isolated from the faeces of wild west lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **64**:449-455.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**:1027-1031.
- Veloo ACM, Welling GW, Degener JE. 2011. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe* **17**:211-212.

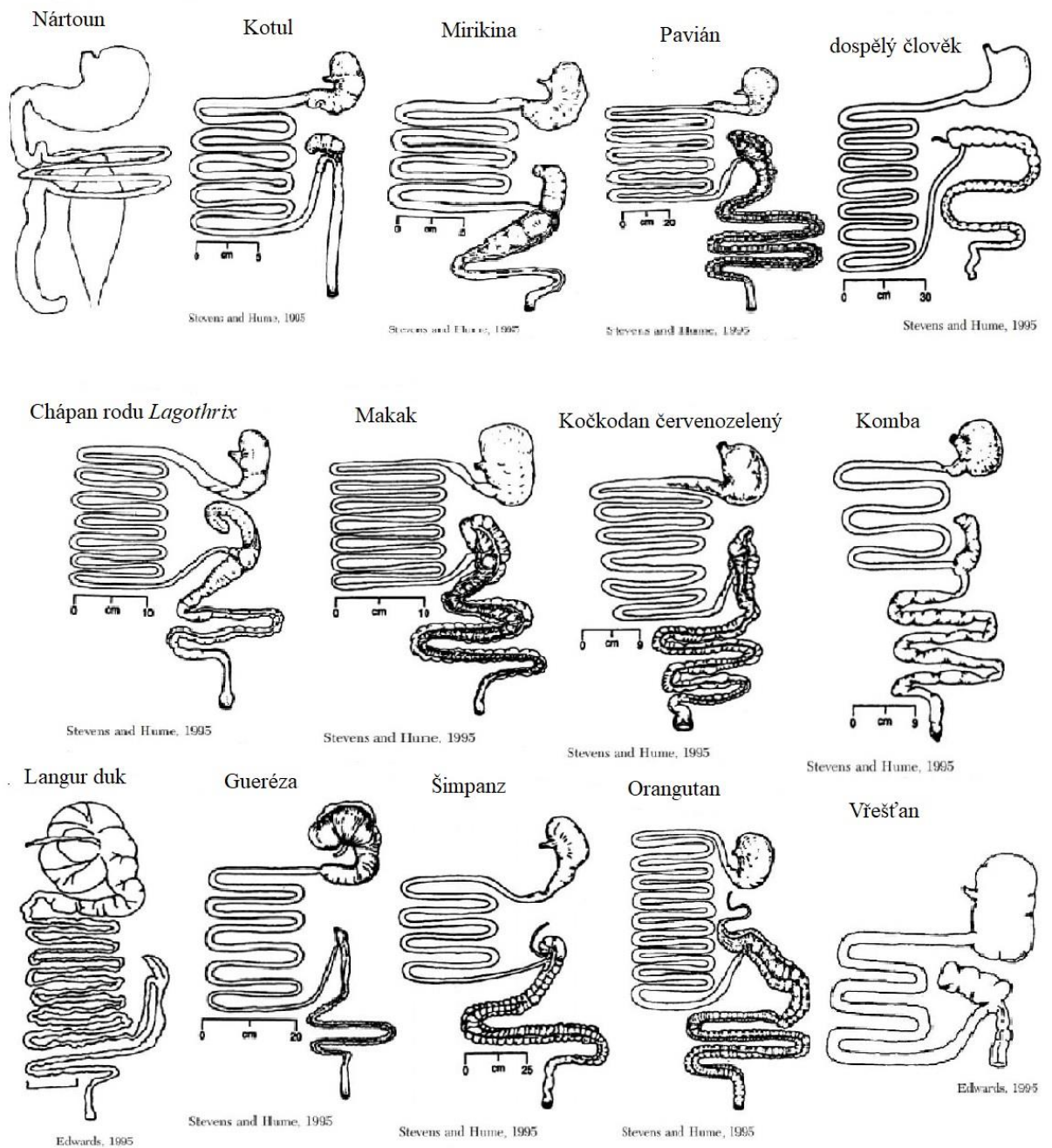
- Ventura M et al. 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. PLoS Genetics 5 (e1000785) DOI:10.1371/journal.pgen.1000785.
- Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2007. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. International Journal of Food Microbiology **120**:2-12.
- Ventura M, O'Flaherty S, Claesson MJ, Turrone F, Klaenhammer TR, van Sinderen D, O'Toole PW. 2009. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. Nature Reviews. Microbiology **7**:61–71.
- Ventura M, Zink R. 2002. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. Applied and Environmental Microbiology **68**:6429-6434.
- Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, De Backer E, Temmerman M, Vanechoutte M. 2005. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. BMC Microbiology **5**:61.
- Vlková E, Salmonová H, Bunešová V, Geigerová M, Rada V, Musilová T. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. Anaerobe **34**:27-33.
- Voreades N, Kozil A, Weir TL. 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. Frontiers in microbiology **5**:494.
- Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. Applied and Environmental Microbiology **74**:4985-4996.
- Wang H, Lee IS, Braun C, Enck P. 2016. Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: a systematic review. Journal of neurogastroenterology and motility **22**:589.
- Warren JR. 2000. Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*. Gastroenterology Clinics of North America **29**:705–751.
- Watanabe K, Makino H, Sasamoto M, Kudo Y, Fujimoto J, Demberel S. 2009. *Bifidobacterium mongoliense* sp nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **59**:1535-1540.
- Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. Science **286**:1888–1893.

Použité obrázky:

- Lugli GA et, al. 2018. Phylogenetic classification of six novel species belonging to the genus *Bifidobacterium* comprising *Bifidobacterium anseris* sp. nov., *Bifidobacterium criceti* sp. nov., *Bifidobacterium imperatoris* sp. nov., *Bifidobacterium italicum* sp. nov., *Bifidobacterium margollesii* sp. nov. and *Bifidobacterium parmae* sp. nov. Systematic and applied mikrobiology **41**:173-183.
- Schnorr SL, Sankaranarayanan K, Lewis Jr CM, Warinner C. 2016. Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies. Current opinion in genetics & development **41**:14-26.

10 Samostatné přílohy

Příloha č. 1: trávicí trakty vybraných druhů primátů (National Research Council 2003)



National Research Council. 2003. Nutrient requirements of nonhuman primates. National Academies Press, Washington, D.C.