

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: NEKO



Ing. Markéta Kypťová

Intenzita bakteriální zátěže v peří a jeho rezistence proti bakteriální degradaci u tropických druhů ptáků afromontánních oblastí Kamerunu

An intensity of plumage bacterial load and resistance against bacteria-caused feather degradation in tropical birds of Afromontane areas of Cameroon

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Veronika Javůrková, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Jakub Kreisinger, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2017

.....

Podpis

Poděkování

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Mgr. Veronice Javůrkové Ph.D., která mi po celou dobu zpracování diplomové práce poskytovala kvalifikované rady, odbornou pomoc a potřebné praktické konzultace. Svému konzultantovi Mgr. Jakubu Kreisingerovi Ph.D. za vstřícnost, cenné rady a také za významnou pomoc při statistickém zpracování dat pro moji diplomovou práci. Na tomto místě také děkuji své rodině za pochopení, pomoc a toleranci. Projekt vznikl za významné podpory postdoktorandského projektu Grantové agentury České republiky číslo 14-16861P.

Abstrakt

Mikroorganismy jsou považovány za významný selekční faktor ovlivňující životní strategie ptáků. Tělní povrch včetně opeření obývá široké spektrum bakterií, které perzistují se svým hostitelem v různých interakčních vztazích. Dosud nejstudovanější a u většiny druhů prokázaná je skupina mikroorganismů rozkládající keratin pera, které mohou opeření a jeho funkci narušovat a svému nositeli tak způsobit nemalé ztráty na jeho fitness. Zdá se tedy pravděpodobné, že tyto peří degradující bakterie a mikroorganismy obecně hrají významnou roli při utváření obranných mechanismů proti jejich negativnímu působení. Za jeden z nejvýznamnějších obranných mechanismů chránící opeření proti působení mikroorganismů je deponace melaninových pigmentů. Předložená diplomová práce se zabývá analýzou celkové bakteriální zátěže v peří a jeho rezistencí vůči bakteriální degradaci u 47 druhů ptáků odchycených v afromontánních oblastech západního Kamerunu. Konkrétním cílem práce bylo za pomoci molekulárních metod stanovit rozdíly v celkovém množství bakterií v opeření u druhů s různými životními, především potravními a reprodukčními strategiemi. Zároveň byla provedena ptilochronologická analýza kvality jejich opeření a pomocí *in vitro* experimentu byla testována schopnost rýdovacích per odolávat bakteriální degradaci. Na základě získaných dat byl vyhodnocen vliv jednotlivých komponent životních strategií a historií na intenzitu bakteriální zátěže v peří, rychlost degradace a úroveň melanizace rýdovacích per u cílových druhů ptáků. Intenzita bakteriálního zatížení v peří nesouvisela s žádným ze zkoumaných faktorů. Naopak z výsledků této studie vyplývá, že vnitrodruhová variabilita v úrovni melanizace pera je zásadním faktorem ovlivňujícím schopností pera odolávat bakteriální degradaci a dále, že míra poškození pera, konkrétně intenzita „feather holes“ koreluje s deponací melaninů v peru. Výsledky této práce jsou unikátní a cenné především v tom, že podobná komparativní studie na tropických druzích ptáků doposud neexistuje.

Klíčová slova: mikroorganismy, degradabilita opeření, životní strategie, tropy, melaniny

Abstract

Microorganisms are considered to be a significant selective factor affecting bird's life strategies. The body cover, including feather, is occupied by a wide range of bacteria that are in their host in different interactions. Group of microorganisms degradate keratins of feather is still most studied and most species of birds have them in feather. This feather degrading bacteria can disrupt the wear and its function and thus cause great losses to its fitness. Therefore, it seems likely that these feathers degrading bacteria and microorganisms generally play a significant role in creating defence mechanisms against their negative effects. One of the most important defence mechanisms to protect feathers against the action of microorganisms is the deposition of melanin pigments. This diploma thesis deals with the analysis of the total bacterial load in feathers and its resistance against bacterial degradation in 47 species of birds trapped in afro-montane areas of western Cameroon. The specific aim of the thesis was to determine differences in the total number of bacteria in plumage in species with different life strategies, especially feeding and reproductive strategies. At the same time, the ptilochronological analysis of the quality of the plumage was performed and *in vitro* experiments were tested for the ability to resist against bacterial degradation. The impact of individual components of life strategies on the intensity of bacterial load in feathers, the rate of degradation and the level of feather melanisation in target species of birds was evaluated based on the obtained data. The intensity of the bacterial load in feathers was not related to any of the examined factors. In contrast, the results of this study show that intraspecific variability in melanization is a key factor influencing the ability to resist bacterial degradation, and that penetration rate, in particular the "feather holes" correlates with penetration of melanins in the feather. The results of this work are unique and valuable, especially since a similar comparative study on the tropical bird species has not yet been established.

Key words: Feather microorganisms, plumage degradability, life strategies, tropics, melanins

Obsah

1. Úvod.....	9
1.1 Peří degradující bakterie.....	10
1.2 Mechanismy ovlivňující negativní vliv působení PDB.....	12
1.2.1 Zbarvení opeření	12
1.2.2 „Preening“, uropygiální žláza a bakterie produkující bakteriociny	14
1.3 Přítomnost ektoparazitů v peří ptáků	15
1.4 Celkové bakteriální společenstvo v peří ptáků	16
1.5 Předpokládané faktory s potenciálem ovlivňovat mikrobiom v peří ptáků.....	17
1.5.1 Efekt hnízdního habitatu a typu hnízdění.....	17
1.5.2 Efekt pohlaví a stáří jedinců	18
1.5.3 Pelichání a množství bakterií.....	20
2. Cíle a hypotézy	22
2.1 Dílčí cíle a hypotézy.....	22
3. Materiál a metodika.....	25
3.1 Lokalita odchyty cílových druhů ptáků.....	25
3.2 Metodiky odchyty a odběru vzorků peří	25
3.2.1 Odběry obrysového peří na molekulární mikrobiologické analýzy.....	25
3.2.2 Odběr rýdovacích per a měření morfologických parametrů.....	26
3.3 Ptilochronologické zpracování rýdovacích per.....	26
3.3.1 Vážení a měření jednotlivých struktur pera.....	26
3.3.2 Stanovení rychlosti růstu rýdovacího pera	27
3.3.3 Kvantifikace „fault bars“ a „feather holes“ na rýdovacích perech	27
3.3.4 Stanovení úrovně melanizace rýdovacích per	29
3.4 Molekulární analýzy intenzity a diverzity mikrobiálního společenstva v peří.....	30
3.4.1 Izolace bakteriální DNA.....	30
3.4.2 qPCR kvantifikace PDB a eubakteriální DNA v peří.....	31

3.5	Stanovení váhy a úrovně melanizace obrysových per	34
3.6	Stanovení degradability rýdovacích per	35
3.6.1	Příprava glycerolových konzerv <i>B. licheniformis</i>	35
3.6.2	Příprava „feather“ media	35
3.6.3	Příprava a provedení testu degradability rýdovacích per	35
3.6.4	Analýzy oligopeptidů po degračním experimentu	36
3.6.5	Statistické zpracování dat	37
4.	Výsledky	40
4.1	Intenzita bakteriální zátěže	40
4.2	Rychlost degradability rýdovacích per	44
4.3	Faktory ovlivňující melanizaci rýdovacích per	48
5.	Diskuze	51
5.1	Celkové bakteriální zatížení peří	51
5.2	Degradabilita rýdovacích per	54
6.	Závěr	57
7.	Použitá literatura	59
8.	Přílohy	72
8.1	Fylogenetický strom všech zkoumaných druhů	72
8.2	Tabulka 11. Průměrná hodnota celkového bakteriálního zatížení pro jednotlivé druhy, u kterých byla hodnota zatížení zjištěna minimálně u dvou jedinců	73
8.3	Tabulka 12. Průměrná hodnota degradability per pro jednotlivé druhy, u kterých byla hodnota degradability zjištěna minimálně u dvou jedinců	74
8.4	„Countmap“ grafické znázornění intenzit bakteriálního zatížení v opeření pro jednotlivé jedince cílových druhů	75
8.5	Obrázek: Znázornění vybraných rýdovacích per testovaných druhů ptáků	76

Seznam použitých zkratk a pojmů

- PDB = peří degradující bakterie
- celkové bakteriální zatížení = kvantitativní proměnná pro veškeré nalezené bakterie v peří jedince, včetně PDB
- FH = „feather holes“ = drobné perforace v praporu pera
- GBW = „growth bar width“ = šířka růstových proužků vyjadřující rychlost růstu pera
- qPCR = quantitative polymerase chain reaction = kvantitativní polymerázová řetězová reakce
- 16S rRNA
- CNCTC = „Czech National Collection of Type Cultures“ – Česká národní sbírka typových kultur
- TSA = „tryptone soya agar“ – trypton sójový agar
- TSB = „tryptone soya broth“ – trypton sójový bujón
- UV = ultrafialové záření

1. Úvod

Mikrobiální společenstvo obratlovců lze považovat za významnou biologickou entitu, v současné době vnímanou také v kontextu celistvého „organismu“ označovaného jako holobiont, což je označení pro organismus hostící další organismy, především mikroorganismy na nebo ve svém těle, dohromady tvořící celek (Zilber-Rosenberg, 2008). Není tedy s podivem, že tato koexistence mikroorganismů s hostitelem má vysoký selekční potenciál a může zásadně ovlivňovat jeho životní strategie a historie. Usuzuje se, že již od druhohor, kdy se začaly odštěpovat a vyvíjet první ptačí linie, započala také koevoluce ptáků s mikroorganismy, které velmi pravděpodobně už od prvopočátku zásadně formovaly ontogenezi, chování, fyziologii a funkci imunitního systému ptáků (Benson a kol., 2014). V současné době jsou k dispozici důkazy z fosilního záznamu o tom, že mikroorganismy měli, velmi pravděpodobně, zásadní vliv na zbarvení a strukturální vlastnosti opeření *Archaeopteryxe*. U vzorků jeho per zkoumali mikrostruktury a našli melanosomy ležící mezi perními paprsky, stejně jako u recentních druhů ptáků (Carney a kol., 2012; Moyer a kol., 2014). Melanosomy jsou intracelulární, membránově vázané organely, kde je syntetizován a skladován melaninový pigment (Marks a Seabra, 2001), který slouží mimo jiné k ochraně peří proti působení mikroorganismů. Obecně jsou interakce mezi mikroorganismy a jejich hostiteli složité a často zahrnují vztahy na úrovni mutualismu, komenzalismu či parazitismu (Ventura a kol., 2009). Tyto interakce se mohou měnit v závislosti na podmínkách prostředí buď hostitele nebo mikroorganismů (Sorci, 2013). Některé mikroorganismy mohou být parazity či patogeny, pokud je vnímáme samostatně, ale ve vhodném prostředí mohou produkovat antimikrobiální látky proti jiným patogenním mikroorganismům (Cash a kol., 2006).

Mikroorganismy žijící v symbióze s obratlovcí, patří do skupin Archea a Eubacteria (Bang a Schmitz, 2015). Některé studie o ptačích symbiotických mikroorganismech zahrnují kvasinky a houby (např. Grizard a kol., 2014), zatímco jiné omezují svůj výzkum na několik známých zástupců enterobakterií (např. Kurzak a kol., 1998; Peralta-Sanchez a kol., 2014). Ptačí komenzální Archea jsou spojeny s ptáky, kteří je využívají při střevní fermentaci rostlinné potravy (Wrede a kol., 2012). Nejsou známé žádné obratlovcí patogeny z domény Archea, ačkoli Eckburg a kol. (2003) navrhuje jejich existenci. Ptačí symbiotické Eubacteria zahrnují například zástupce z kmenů Actinobacteria (např. *Micrococcus* spp.), Bacteroidetes (*Bacteroides* spp.), Firmicutes

(*Clostridium* spp., *Bacillus* spp.), Mollicutes (*Mycoplasma* spp.) a Proteobacteria (*Enterobacter* spp., *Escherichia coli*; Lu a kol., 2008; Soler a kol., 2011; Su a kol., 2014; Waite a Taylor., 2014). Tito zástupci eubakterií jsou pro svého hostitele buďto prospěšné, patogenní nebo mají prozatím se svým hostitelem neznámé či neobjevené funkční vztahy a interakce.

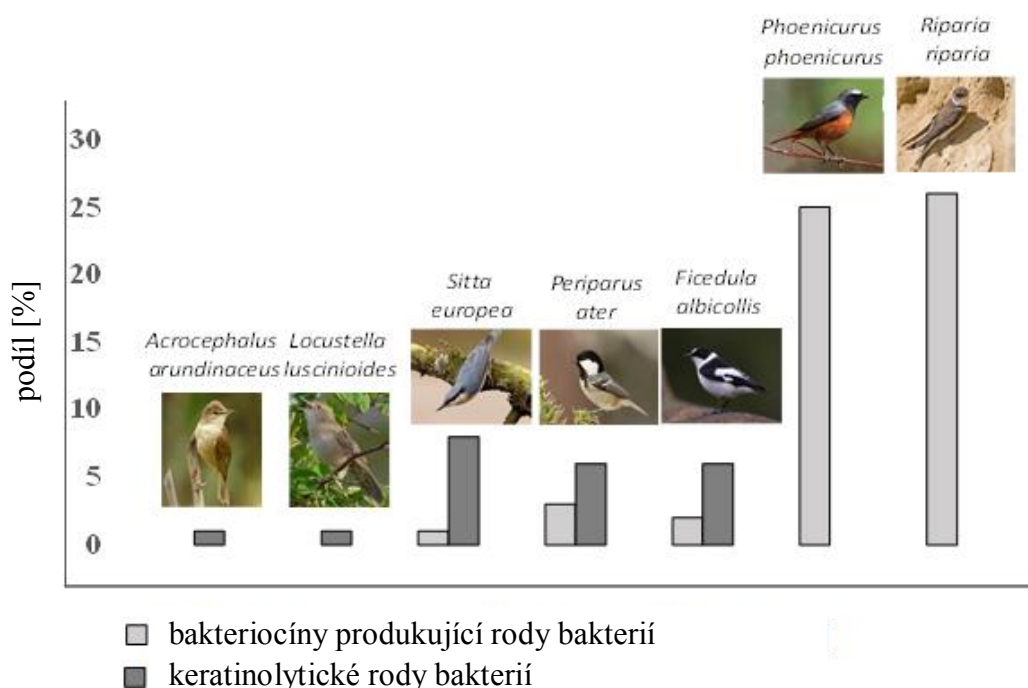
Kromě intestinálního mikrobiomu (Kreisinger a kol., 2015, 2017) je u ptáků v současné době věnována největší pozornost studiu mikroocenóz, nalézajících se v peří a uropygiální žláze. Tyto mikroocenózy vykazují poměrně vysoký stupeň diverzity (Burt a Ichida, 1999; Shawkey a kol., 2003, 2005; Whittaker a kol., 2005; Vere a kol., 2014; Dille a kol., 2016; Ruiz-Gonzalez a kol., 2016; Kent a Burt, 2016), která je přisuzována zejména vysokému stupni ptačí disperze spojené se schopností letu (Burt a Ichida, 1999; Shawkey a kol., 2005; Bisson a kol., 2007, 2009). Z těchto bakterií jsou některé symbiotické a produkují prospěšné antimikrobiální látky (např. *Enterococcus* spp.; Ruiz-Rodríguez a kol., 2009; Martinez-Garcia a kol., 2015), zatímco jiné jsou patogenní a buďto vyvolávají vnitřní infekce (review Hubálek, 2004; Benskin a kol., 2009) nebo enzymaticky tráví keratin, základní stavební jednotku pera (tzv. keratinolytické bakterie; Ramnani a kol., 2005). Degradace ptačího opeření keratinolytickými bakteriemi byla prokázána jak *in vitro* experimentech (Ichida a kol., 2001; Ramnani a kol., 2005; Ruiz-Rodríguez a kol., 2009), tak v podmínkách *in vivo* (např. Cziráková a kol., 2013; Giraudeau a kol., 2013; Leclaire a kol., 2014). Tato skupina bakterií je obecně označována jako peří degradující bakterie (dále jen PDB).

Peří degradující bakterie

Jak bylo naznačeno výše, největší pozornost byla u ptáků doposud věnována peří degradujícím bakteriím, vyskytujícím se přirozeně v peří ptáků.

Přestože incidence PDB napříč ptačími taxony nebyla doposud detailně studována, v recentní komparativní studii porovnávající na základě kultivačních metod přítomnost PDB u 3548 jedinců náležících k 154 druhům ptáků napříč různými taxony odhalila přítomnost PDB u 39% zkoumaných druhů (Kent a Burt, 2016). Největší abundance PDB byla nalezena v peří druhů hledajících potravu na zemi, což je prostředí s největším prokázáním zastoupením PDB (Bach a kol., 2011). Podobně druhy obývající vodní prostředí měly více PDB než ostatní porovnávané gildy v jedné z klíčových studiích Burt a Ichida (1999).

Výsledky nejnovější studie ukazují, že druhy hledající potravu na zemi měly velmi podobný výskyt PDB jako druhy lovcí potravu za letu ve vzduchu a druhy sbírající potravu na listech. Nicméně druhy hledající potravu na stromech a nektarivorní druhy vykazovaly menší množství PDB v porovnání s ostatními druhy (Kent a Burt, 2016). V detailní studii mikrobiomu nacházejícího se v peří temperátních druhů ptáků, založené na pyrosekvenční analýze eubakteriální 16S rRNA, byl výskyt keratinolytických bakteriálních rodů detekován primárně u dutinově hnízdících druhů ptáků, zatímco menší podíl těchto rodů byl nalezen pro ptáky hnízdící v otevřených hnízdech (Javurkova a kol., nepublikovaná data; viz Obrázek 1).



Obrázek 1: Podíl (%) bakteriálních rodů detekovaných v peří vybraných temperátních druhů pěvců s prokázaným keratinolytickým či bakteriociny produkujícím potenciálem (Javurkova a kol., nepublikovaná data).

Díky schopnosti rozkládat keratin, tvořící základní stavební jednotku pera, mohou PDB zásadně ovlivňovat jeho kvalitu (viz např. Burt a Ichida, 1999; Gunderson a kol., 2008). Bylo prokázáno, že PDB hrají zásadní roli v evoluci ptačího zbarvení, které je zároveň pod silnou sexuální selekcí tím, že zásadně ovlivňují signální potenciál opeření (např. Goldstein a kol., 2004; Shawkey a kol., 2007; Gunderson a kol., 2009; Leclaire a kol., 2014; Ruiz-Rodríguez a kol., 2015; ale viz Jacob a kol., 2014). PDB mohou hrát roli také v načasování pelichání (Gunderson a kol., 2008), v intenzitě péče o opeření potíráním sekrety z uropygiální žlázy (Leclaire a kol., 2015) či dokonce

v pravděpodobnosti stát se kořistí predátora (Moller a kol., 2012). Kromě toho, vysoká abundance PDB narušuje funkci peří tím, že způsobuje jeho strukturální poškození (Fülöp a kol., 2016), což může v konečném důsledku vést ke snížení tepelné izolace (Brush, 1965; Booth a kol., 1993) či schopnosti letu (Swaddle a Witer, 1997). Z výše uvedeného je zřejmé, že keratolytické bakterie vytvářejí významný selekční tlak na ptačího hostitele, pro kterého je velmi důležité zdokonalovat své mechanismy eliminující působení PDB, které mu pomáhají lépe prosperovat a mít vyšší celkové fitness.

Mechanismy ovlivňující negativní vliv působení PDB

1.2.1 Zbarvení opeření

Jeden z důležitých obranných mechanismů ptačího opeření proti působení PDB je jeho zbarvení. Především deponace melaninu do integumentu je napříč obratlovci hojně využívanou obrannou strategií proti působení vnějších podmínek. U ptáků je mnoho studií *in vitro* poukazujících na to, že tmavé, melanizované peří více odolává bakteriální degradaci způsobené PDB než světlé, nemelanizované peří (Goldstein a kol., 2004; Gunderson a kol., 2008). Ruiz-de-Castañeda a kol. (2011) ve své studii zkoumali rozdíly v degradabilitě pera mezi melanizovanou a nemelanizovanou částí rýdovacího pera lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) a zjistili, že existují mikrostrukturální rozdíly v příčném řezu pera. Vnitřní mikrostruktury melanizovaného pera jsou širší a tím pádem lépe odolnější proti degradaci či jinému, např. mechanickému opotřebením. Avšak nejen melanin, ale např. i karotenoidy deponované do opeření mohou chránit pero před bakteriální degradací. Shawkey a kol. (2009) studovali barevnost per hýlů mexických (*Carpodacus mexicanus*) a zjistili, že červenější samci mají v peří méně PDB, ale téměř stejné množství celkového počtu bakterií při porovnání s méně červenými samci. Dalším typem barviv v peří ptáků jsou psitakofulviny, které odpovídají za červená, oranžová a žlutá zbarvení u papoušků (Psittaciformes). Burt a kol. (2011) vystavili papouščí různě barevné peří *B. licheniformis* a zjistili, že existují rozdíly v rezistenci před degradací bakteriemi, což naznačuje, že se barevné vzory mohly v rámci skupiny papoušků vyvinout k odolnosti před bakteriální degradací kromě toho, že mají i zásadní roli v komunikaci.

Fakt, že melanizace pera je zásadní faktor ovlivňující jeho rezistenci vůči bakteriální degradaci byl prokázán i ve studii Burt a Ichida (2004), studující rychlost degradability opeření PDB izolovanými z peří jedinců strnadce zpěvného (*Melospiza*

melodia), obývajících dva různé habitaty (vlhký a suchý). Jedinci žijící v těchto různě humidních habitatech zároveň vykazovali vysoký stupeň polymorfismu v melaninovém zbarvení opeření. Zjistili, že opeření z více melanizovaných jedinců humidního habitatu odolávalo bakteriální degradaci lépe ale zároveň PDB izolované z peří těchto jedinců mělo silnější keratinolytický potenciál, v porovnání s PDB z peří jedinců, obývajících sušší habitat. Tato studie tak potvrdila dva předpoklady. První z nich je, že mikrocenózy v peří ptáků včetně PDB lépe prosperují v teplejších a vlhčích habitatech (viz také Burt a Ichida, 1999) a druhý, že ve vlhčích habitatech mají ptáci tmavší zbarvení díky deponovaným melaninům (Peele a kol., 2009), které jejich opeření velmi pravděpodobně chrání, mimo jiné i vůči bakteriální degradaci.

Ptáci své peří používají také jako materiál při stavbě hnízd. Vkládají ho do hníz z mnoho důvodů, jedním z tradičních důvodů je termoregulace (Moller, 1991) nebo také ochrana před ektoparazity. Důležité je celkové prostředí v hnízdě a také zatížení hnízda mikroorganismy (Cook a kol., 2003,2005). Nejvíce detekované bakterie v peří patří mezi rody *Enterococcus*, *Staphylococcus* (Parisien a kol., 2008), *Streptomyces* (Omura a kol., 2001) a *Bacillus* (Burtta a Ichida, 1999; Gunderson, 2008). Tyto bakterie jsou známy jako producenti antibiotických látek, proto mohou sloužit jako ochrana před patogenními bakteriemi jako jsou *Enterobacteriaceae* a *Staphylococcus*, často se nacházející ve vejcích mrtvých mláďat (Bruce a Drysdale, 1994). Peralta-Sanchez a kol. (2010) testovali, jestli rozdíl mezi barvou per v hnízdě ovlivňuje mikrocenozu celého hnízda, zejména počet mikroorganismů vyskytujících se na skořápkách vajec u vlaštovky obecné. Přišli na to, že v hnízdech s experimentálně vloženým bílým peřím bylo méně bakterií než v těch s tmavým opeřením. Při podobných experimentech zkoumající mikrobiální společenstvo v hnízdě bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita byla vyšší v hnízdech s bílým peřím, což negativně koreluje s bakteriální denzitou. Tyto výsledky naznačují, že antimikrobiální vlastnosti mikroorganismů nacházejících se v peří ovlivňují prostředí v hnízdě, a dokonce i úspěšnost líhnutí a tím pádem celého rozmnožovacího úsilí rodičů (Peralta - Sanchez a kol., 2014).

Je však nutno podotknout, že kromě obrany pera před jeho bakteriální degradací, mají deponované melaniny zajisté mnoho dalších funkcí jako je např. termoregulace (Walsberg, 1983), sociální signalizace (Griffith a kol., 2006), krypse (Zink a Remsen, 1986), či melaniny pero zpevňují a zlepšují jeho odolnost proti mechanickému opotřebení (Bonser, 1995; Butler a Johnson, 2004).

1.2.2 „Preening“, uropygiální žláza a bakterie produkující bakteriociny

U jedinců jejichž peří obsahuje menší množství melaninů může jako kompenzace sloužit zvětšená uropygiální žláza (Roulin, 2007), jejíž sekrety slouží k ochraně ptačího peří. Jako důkaz této myšlenky, lze považovat studii, kdy Giraudeau a kol. (2010) zablokoval divokým kachnám (*Anas platyrhynchos*) přístup k sekretům umístěním cévky přes uropygiální žlázu a zjistil, že stav peří se zhoršil u kachen s omezeným přístupem k sekretům už za tři měsíce.

Bakterie žijící symbioticky v uropygiální žláze (zejména druh *Enterococcus faecalis*, Martín-Platero a kol., 2006; Martín-Vivaldi a kol., 2009; Ruiz-Rodríguez a kol., 2012, 2013) jsou ptáky distribuovány spolu se sekrety uropygiální žlázy do opeření díky „preeningu“ (Shawkey a kol., 2003; Soler a kol. 2008; Moller a kol., 2009; Martín-Vivaldi a kol., 2010), kde svému hostiteli udělují různé ekologické výhody. V peří se tedy kromě PDB vyskytují také bakterie schopné produkovat bakteriociny (Javurkova a kol., nepublikovaná data; ale viz Obrázek 1 výše), což jsou látky působící obdobně jako antibiotika (Jacob a Ziswiler, 1982). Bakteriociny jsou nejčastěji využívány bakteriemi k tomu, aby vytlačily ze společenstva své příbuzné kompetitory, což mohou být právě bakterie ptákovi škodící (Strompfova a kol., 2003). Sekrety uropygiální žlázy mohou výrazně regulovat množství mikroorganismů (Jacob a kol., 1997; Shawkey a kol., 2003; Soler a kol., 2008; Reneerkens a kol., 2008; Moller a kol., 2009) a dalších ektoparazitů běžně se vyskytujících v peří (Galván a kol., 2008; Moreno-Rueda, 2010).

Bylo prokázáno, že kromě těchto funkcí, může uropygiální žlázy ovlivnit také predaci ptáků dravci a to tak, že antimikrobiální sekrety dokáží redukovat množství PDB, což ve výsledku pravděpodobně vede ke zlepšení letových schopností ptáků, kteří se tak dokáží lépe vyhnout predaci. Tuto skutečnost potvrdila studie o 56 ptačích druzích, které jsou kořistí jestřába lesního (*Accipiter gentilis*) (Moller a kol., 2010). Sekrety uropygiální žlázy dále chrání opeření před mechanickým opotřebením (Moreno-Rueda, 2011), mohou ovlivňovat celkový vzhled a intenzitu zbarvení opeření, což je důležité především ve vnitrodruhové vizuální komunikaci (Lopez-Rull a kol., 2010). Zajisté také mohou sloužit jako chemické signály v ptačí intra - a inter-specifické komunikaci (Leclaire a kol., 2011; Whittaker a kol., 2011; Soini a kol., 2007).

Údržba opeření je však energeticky a časově náročná činnost (Moller, 1991; Cotgreave a Clayton, 1994; Viblanc a kol., 2011). Několik studií prokazuje, že přítomnost

PDB a obecně mikroorganismů v peří ovlivňuje trade-off mezi rodičovskou péčí a údržbou opeření, což může zásadně ovlivňovat jeho reprodukční úspěch (Burt a Ichida, 1999; Muza a kol., 2000; Alt a kol., 2015). Ptáci obecně investují méně do péče o sebe a o své opeření během rozmnožovacího období (Hails a Bryant, 1979; Partridge a Harvey, 1985). To může vést k nárůstu zatížení peří jak mikroorganismy, tak ektoparazity a následnému zhoršení kvality opeření (Jacob a kol., 1997; Burt a Ichida, 1999). Pokud se jedinci snaží tento negativní vliv eliminovat zvýšenou péčí o své opeření, redukují tím investice do péče o potomstvo, což pak ve výsledku vede ke snížení jejich celkového reprodukčního úspěchu (Lucas a kol., 2005).

Přítomnost ektoparazitů v peří ptáků

Spolu s bakteriemi se v peří a v hnízdech ptáků vyskytují také společenstva ektoparazitů, jako jsou péřovky (Ischnocera) z řádu vši a všenek (Phthiraptera; Price a kol., 2003) či roztoči (např. čmelíkovec jižní *Ornithonyssus bursa*; Galván a kol., 2008). Přestože význam přítomnosti těchto ektoparazitů na fitness svých hostitelů není doposud zcela objasněn, v několika studiích se poukazuje na fakt, že mohou být tyto ektoparazité zodpovědní za omezení přítomnosti PDB a snížení jejich abundance, protože se jimi živí (Blanco a kol., 1997, 2001; Jovani a Blanco, 2000), dále mohou mít jako potravu starý sekret z uropygiální žlázy a nebo detrit akumulovaný na peří, tímto způsobem svému hostiteli pomáhají mít lepší opeření a můžeme je považovat za komenzály ptáků (Soler a kol., 2012).

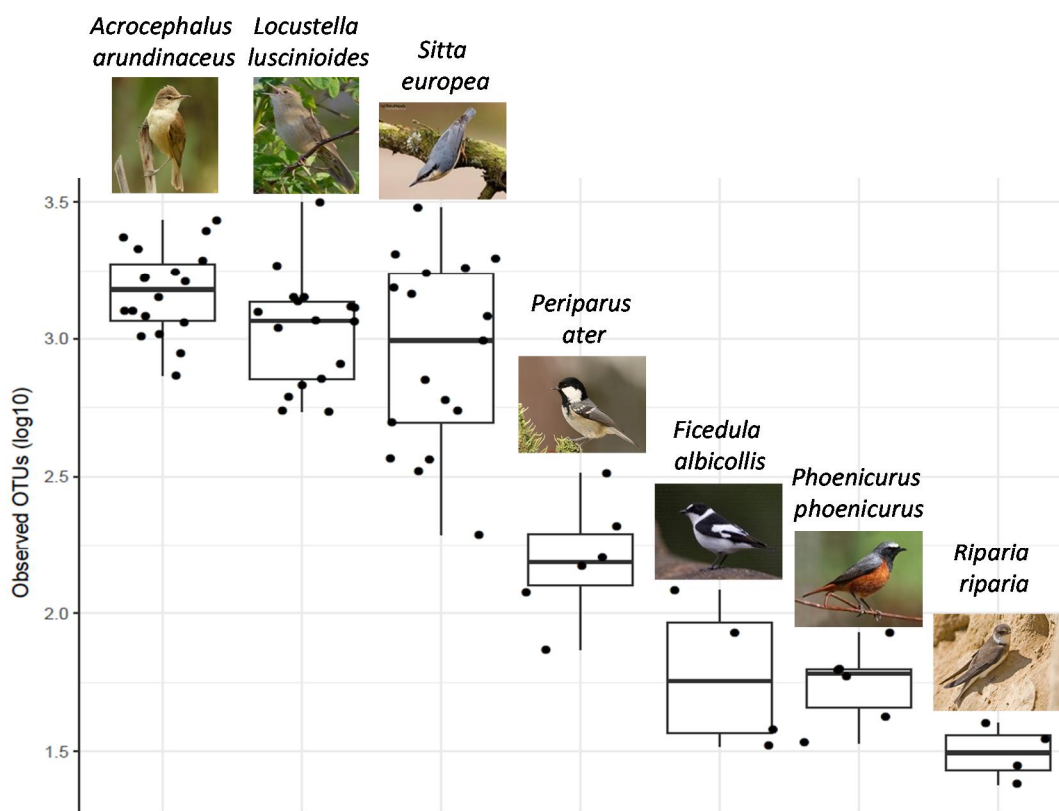
Naopak, jiné studie zase naznačují, že přítomnost těchto vybraných ektoparazitů v peří ptáků může souviset s tvorbou jemných perforací v praporu pera, tzv. „feather holes“ (dále jen FH) a mohou tak způsobovat mírné poškození opeření. Např. Vas a kol. (2008) naznačuje, že intenzita FH velmi pravděpodobně souvisí s přítomností všenek rodu *Brucelia* spp. Mechanismy vzniku FH za spoluúčasti ektoparazitů naznačuje ve své studii Vágási (2014). Ten udává jako příčinu vzniku těchto perforací 3 možné hypotézy. První z nich přisuzuje vznik FH právě všenkám, jejichž výskyt pozitivně koreluje s počtem FH (Moller, 1991). Jednou z nich je tvorba FH u druhů či jedinců vystavených zvýšenému stresu, který zapříčiní zhoršené podmínky během růstu pera a ty se pak odrazí na jeho kvalitě a zvýšené perforaci praporu (Murphy a kol., 1989). Třetí hypotéza se zdá být nejvíce intuitivní, a to z důvodu, že je vznik dírek přisuzován působení PDB. Ty mohou keratin degradovat i u vodních druhů ptáků (Vágási, 2011), u kterých již všenky

detekovány nebyly a tím pádem je u nich vyloučena možnost vzniku dírek pomocí všenek.

Celkové bakteriální společenstvo v peří ptáků

Mikrobiom v peří ptáků však netvoří pouze PDB, ale poměrně diverzifikovaná, druhově specifická společenstva mikroorganismů (Shawkey a kol., 2005; Javurkova a kol., nepublikovaná data; ale viz Obrázek 2), která mohou mít pro svého nositele zásadní význam (Moller a kol., 2012). Jedna nedávná studie zjistila, že ptáci pokusně vystaveni vyššímu zatížení celkovým počtem kultivovaných bakterií včetně PDB mají nižší imunitní odpověď měřenou PHA skin-swelling testem, zatímco ptáci vystaveni nižšímu bakteriálnímu zatížení peří měli vyšší schopnost usmrcovat bakterie v krvi, což je hodnota měřící schopnost eliminovat bakteriální patogeny. U dalších složek imunitní odpovědi jako je např. hemaglutinace nebyl nalezen efekt bakteriálního zatížení, lze tedy říci, že bakteriální zatížení opeření má významné fyziologické důsledky (Leclaire a kol., 2015).

Jak bylo naznačeno výše, mikroorganismy jsou v peří ptáků běžné, i když intenzity mikrobiálního zatížení i diverzita mikroocenóz je velmi variabilní, jak mezi druhy (Burt a Ichida, 1999; Saag a kol., 2011; Kent a Burt, 2016; viz také Obrázek 2), tak uvnitř druhů (Moller a kol., 2009; Czirjak a kol., 2010; Fülöp a kol., 2016). Tyto rozdíly mohou být určeny jak jednotlivými komponenty životních strategií, tak ekologickými faktory, spojenými s životními podmínkami svých hostitelů (Burt a Ichida, 1999; Saag a kol., 2011; Kent a Burt, 2016). Například mikrobiom v opeření ptačích druhů je nepochybně ovlivněn jejich potravním stanovištěm (Burt a Ichida, 1999), pohlavím (Saag a kol., 2011) či sezónními rozdíly nalezenými v jejich potravních stanovištích (Burt a Ichida, 1999). Evans a kol. (2017) obecně předpokládá, že druhy považované za generalisty či omnivory, jsou více vystaveny široké škále bakteriálních společenstev, zatímco více potravně specializované druhy jsou vystaveny mnohem užší bakteriální diverzitě. Dále lze předpokládat, že druhy, které kooperují při sběru potravy, mezi sebou sdílejí bakteriální společenstvo s mnohem větší pravděpodobností než druhy, které vyhledávají potravu individuálně. Totéž by se dalo předpokládat u druhů, u kterých samec krmí samici v době hnízdění, kdy bude pravděpodobně docházet ke sdílení bakterií.



Obrázek 2: Alfa diverzita mikroorganismů (počet OTUs a Shannonův index) detekovaných v peří temperátních druhů pěvců lišících se migračními strategiemi (rezident vs. dálkový migrant) a typem hnízdění (otevřená hnízda vs. dutiny). Data založena na pyrosekvenační analýze 16S rRNA (Javurkova a kol., nepublikovaná data).

Předpokládané faktory s potenciálem ovlivňovat mikrobiom v peří ptáků

1.5.1 Efekt hnízdního habitatu a typu hnízdění

Habitat obecně či lokalita hnízdění je důležitý ekologický faktor, který může mít významný dopad na diverzitu a hustotu bakterií v peří (Bisson a kol., 2007, 2009; Peele a kol., 2009; Saag a kol., 2011). Lokalita hnízdění může do velké míry determinovat intenzitu i diverzitu bakteriálního společenstva v peří nepřímo, díky přidruženým mikroklimatickým podmínkám jako jsou např. teplota a vlhkost ovlivňující rychlost bakteriální proliferace (Stolp, 1988). Teplota patří mezi faktory ovlivňující mikrobiální infekci také přímo. Experimentální studie Theron a kol. (2003) demonstrovala vyšší počet bakterií na slepičích vejcích exponovaných vyšším teplotám než na vejcích

exponovaných teplotám nižším. Avšak Cook a kol. (2003) poukázali na to, že v přírodních podmínkách nesou vejce v chladném humidním prostředí více bakterií na skořápce než vejce v teplých a suchých habitatech. Lze tedy předpokládat, že v přirozených podmínkách hnízdního habitatu, teplota prostředí působí na přítomnost mikroorganismů v hnízdě. V těsném vztahu s humiditou je i riziko proniknutí bakterií do vnitřních struktur vejce (Ruiz-de-Castañeda a kol., 2011). Vlhkost může ovlivňovat srážení vodních par na povrchu skořápky. S intenzitou srážek pozitivně korelovalo i mikrobiální zatížení v hnízdních dutinách špačků obecných (*Sturnus vulgaris*) (Berger a kol., 2003). Dále bylo prokázáno, že růst a diverzifikaci mikroorganismů na skořápce jsou podpořeny přítomností vody na povrchu vajec (Board, 1966; Board a Halls, 1973; Board a kol., 1979). Je zřejmé, že pro pravděpodobnost výskytu mikroorganismů jsou zásadní podmínky hnízdního mikroklimatu, především teplota a humidita.

Protože tropické oblasti nejsou limitovány vlhkostí, mikroorganismy tam vykazují vysokou diverzitu a abundanci a jejich růst a šíření není limitováno tak jako v temperátních oblastech. To způsobuje, že mikrobiální zátěž snůšky v těchto klimatických podmínkách roste spolu s dobou její expozice a rodiče tak čelí zhoršeným podmínkám pro svá mláďata (Cook a kol., 2003, 2005; Shawkey a kol., 2009).

Vliv na přítomnost mikroorganismů v hnízdě může mít také typ hnízda a hnízdní materiál (Godard a kol., 2007; Peralta-Sánchez a kol., 2012). Ptáci mohou cíleně přizpůsobit hnízdo podmínkám prostředí, tak aby vytvořili vhodné mikroklima pro rozvoj embrya a následně pro rostoucí potomky (Hansell, 2000). Nová hnízda každou hnízdní sezónu si staví většina ptáků, zatímco používání stejného hnízda několik sezon je vzácné (Hansell, 2000; Wiebe a kol., 2007). Pro ptáky hnízdící v dutinách je ovšem dostupnost nových míst pro umístění snůšky limitující, často proto využívají dutiny a hnízda z minulé sezóny i přes riziko vysoké bakteriální infekce (Clark a Mason, 1988; Walls a kol., 2012). Wang a kol. (2011) prokázali, že vejce nakladená do hnízdicích starších budek měla počáteční mikrobiální zatížení vyšší než vejce v nových budkách. Jednou z příčin vyššího bakteriálního zatížení na vejcích exponovaných ve znovu využívaných dutinách může být tedy stáří hnízda (Wang a kol., 2011; Walls a kol., 2012). Otevřená hnízda postavená na zemi nebo na stromech, jsou téměř vždy vystavena okolní vlhkosti a mohou být vystavena rapidnějším změnám a fluktuacím teplot. To vede k vyšší míře infekce vnitřních struktur vejce a nižší líhivosti v otevřených než v dutinových hnízdech (Godard a kol., 2007). U špačků obecných bylo také poukázáno na to, že jedinci hnízdící ve svých dutinových hnízdech opakovaně, zabudovávali zelené rostliny do svého hnízda šestkrát častěji než

ptáci, kteří si stavěli hnízda nová (Clark a Mason, 1985). Jako hnízdní materiál používá mnoho druhů ptáků části čerstvých zelených rostlin (Sengupta a Sengupta, 1981). Toto chování lze vysvětlit tak, že se ptáci snaží zabránit negativnímu vlivu parazitů a patogenů v hnízdě. Rostliny jako je levandule či máta přinesené do hnízda sýkory modřinky na Korsice měly také negativní vliv na množství a diverzitu bakterií na těle mládřat (Mennerat a kol., 2009). Goodenough a Stallwood (2010) ukázali, že odlišný hnízdní materiál může nést rozdílné mikroorganismy u dvou dutinově hnízdících pěvců, sýkoře koňadře a sýkoře modřince. Běžně používaným materiálem k vystýlání hnízd je peří (Hansell, 2000). Peří plní isolační funkci a mimo té obsahuje mikroorganismy, které mohou ovlivnit podmínky v hnízdě a kolonizovat vaječný povrch (Peralta-Sanchez a kol., 2010), více o této problematice viz kapitola.

1.5.2 Efekt pohlaví a stáří jedinců

Rozmnožování znamená různé aktivity, způsobující přímou výměnu bakteriálních společenstev mezi životním prostředím a rodiči. Dospělí ptáci mohou získat některé bakterie z půdy (například při shromažďování hnízdního materiálu či později při sběru potravy pro krmení partnera či mládřat na hnízdě). Jak již bylo zmíněno, půda je substrát, ve kterém je velké množství bakterií, které jsou schopné degradovat peří (Lucas a kol., 2003; Bisson a kol., 2007). Podobně se ptáci mohou PDB „infikovat“ v průběhu inkubace přes přímý kontakt s hnízdním materiálem (Peralta-Sanchez a kol., 2010, 2014).

Existuje obecný předpoklad, že samice mají více bakterií v peří než samci (Saag a kol. 2011a). Vyšší bakteriální zatížení u samic oproti samcům bylo nalezeno u špačka obecného (Lucas a kol., 2005), u vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) (Moller a kol., 2009) nebo u vrabce domácího (*Passer domesticus*) (Pap a kol., 2010). Tyto pohlavní rozdíly mohou být způsobeny zejména tím, že samice vykonávají různé aktivity během období rozmnožování, jako je například stavění hnízda (Kilgas a kol., 2012), kdy hnízdní materiál sbírají ze země nebo samice některých druhů přenocují v budce během období hnízdění, kdežto samci nocují v korunách stromů (Moller a kol., 2009). Fülöp a kol. (2017) došli k výsledkům, že mikro habitat ovlivňuje abundanci bakterií vyskytujících se v peří, ale pouze u samic vlaštovky obecné. Zjistili, že abundance bakterií v peří u samic hnízdících ve stájích s hospodářskými zvířaty byla výrazně vyšší než u stejného druhu hnízdícího v prázdných stájích, u samců vliv prokázán nebyl.

Oproti tomu samice vykazují menší diverzitu bakterií v peří narozdíl od samců, což je v protikladu s tím, že mají bakterií v peří více (Shawkey a kol., 2003). Jednou z hypotéz vysvětlující nižší celkovou bakteriální diverzitu v peří samic je, že mají více dominantních bakteriálních druhů bakterií v peří, které vykompetují jiné druhy a tím potlačují celkovou bakteriální diverzitu u samic. Méně dominantních druhů bakterií mají naopak samci, protože jsou více disperzní v době hnízdění a vyskytují se v prostředí s diverzifikovanější mikroflórou. Jejich čas strávený péčí o potomky je navíc nižší, proto se mohou více věnovat údržbě svého opeření potíráním sekretů uropygiální žlázy, které inhibují růst a množství dominantních bakterií zejména PDB (Shawkey a kol., 2003), ale celkovou taxonomickou bohatost bakterií v jejich opeření neomezují (Saag a kol., 2011b).

Vyšší množství bakterií v peří rodičů s menším počtem mláďat bylo také nalezeno u sýkory koňadry. Pravděpodobně protože ptáci s větším množstvím bakteriální v peří jsou buď méně kvalitní jedinci, či nezkušení mladí ptáci, pro které je tak nákladná investice do péče o mláďata, že jim brání v péči o vlastní opeření (Saag a kol., 2011). Složení mikroorganismů v peří mladých jedinců bývá podobné jako jejich matek, s kterými byli v době líhnutí a následném dospívání nejvíce v kontaktu (Ruiz-Rodriguez a kol., 2014).

1.5.3 Pelichání a množství bakterií

Studie zkoumající tropické druhy se zabývají také rozdíly ve způsobech jejich pelichání. U tropických ptáků lze vysledovat různé strategie v pelichání a někdy dochází i k tomu, že pelichají a hnízdí zároveň, což umožňuje prodloužit doby pelichání (Johnson a kol., 2012). Doba trvání a načasování pelichání může významně ovlivnit hmotnost peří (De la Hera a kol., 2010), výslednou expresi barev (Serra a kol., 2007) a kvalitu struktury peří (Dawson a kol., 2000). Peří roste rychleji ptákům se zkrácenou dobou pelichání, ale produkují peří nižší kvality, a to pak může zapříčinit horší strukturální vlastnosti peří (Dawson a kol., 2000; Hall a Fransson, 2000; Serra a kol., 2007). Otázkou tedy je, zda rozdíly v rychlosti růstu opeření u tropických ptáků mohou ovlivňovat jeho rezistenci vůči degradaci PDB.

Bisson a kol., (2007) provedli jednu z mála studií zabývajících se rozdíly mezi bakteriemi v peří tropických a temperátních druhů. Studie byla založena na zkoumání rozdílů v intenzitě a diverzitě bakteriálního společenstva v peří spolu s porovnáním vzorků půdy sebraných v tropických a v temperátních oblastech typických pro výskyt

zkoumaných druhů. Přišli na to, že v tropických oblastech měl jejich zkoumaný druh lesňáček lejskovitý (*Setophaga ruticilla*) více bakterií v peří než tento druh obývajících temperátní oblasti a stejný efekt byl prokázán také pro vzorky půdy. Což naznačuje, že mikrobiom v peří ptáků tropických oblastí by měl být obecně intenzivnější a více diverzifikovaný. Zároveň by tyto druhy měly mít lépe vyvinuté mechanismy, které chrání jejich opeření před bakteriemi indukovanou degradací.

Navzdory čím dál častějším důkazům o velké diverzitě bakterií v peří ptáků jsou stále velmi omezené informace o tom, jakou funkci tento mikrobiom v ptačím opeření plní. Proto je potřeba se této problematice v budoucím výzkumu více věnovat a odhalit tak dosud netušené interakce a vztahy související s koevolucí mikroorganismů a ptačího hostitele

2. Cíle a hypotézy

V předložené diplomové práci bylo mým hlavním cílem provést studii zabývající se souvislostmi mezi bakteriální zátěží v krycím opeření tropických druhů ptáků afromontánních oblastí Kamerunu lišících se habitatem výskytu a vybranými charakteristikami životních a reprodukčních strategií. Zároveň byla u těchto druhů porovnávána rezistence jejich opeření vůči degradaci keratinolytickými bakteriemi a studovány mechanismy, které jsou za úroveň této rezistence zodpovědné. Přestože se u tropických druhů ptáků obecně předpokládá vyšší bakteriální zatížení v opeření, ať už s ohledem na rozdílné environmentální podmínky a zcela odlišné životní i reprodukční strategie, tyto souvislosti nebyly u tropických druhů ptáků doposud podrobně studovány.

Dílčí cíle a hypotézy

Konkrétní dílčí cíle a postulované hypotézy řešené v rámci této diplomové práce byly následující:

1. Prvním cílem práce bylo zjistit a porovnat, jak se mění intenzita mikrobiální zátěže spolu s vybranými charakteristikami životních a reprodukčních strategií tropických druhů ptáků. Konkrétně jsme se zaměřili na zkoumání vztahu mezi intenzitou mikrobiální zátěže v peří s ohledem na:

A) Habitat daného druhu

Zde jsme rozlišovali mezi rozdíly u druhů obývajících převážně lesní uzavřené biotopy a otevřené biotopy pastvin a lučin.

- a) Předpokládáme, že druhy uzavřených a více humidních lesních biotopů budou vykazovat intenzivnější mikrobiální zátěž v peří v porovnání s druhy otevřených a sušších stanovišť.

B) Typ potravy

Zde jsme rozlišovali mezi kategoriemi fruktivoři-omnivoři, nektarivoři, semenožravé druhy, hmyzožravé druhy.

- b) Předpokládáme, že více specializované druhy jako fruktivoři či nektarivoři či striktně semenožravé či hmyzožravé druhy budou ve svém opeření hostit méně intenzivní mikrobiální společenstvo v porovnání s druhy omnivorními.

C) Způsob sběru potravy

Zde jsme porovnávali úroveň vertikální stratifikace při sběru potravy a rozlišovali mezi druhy obstarávajícími potravu: a) na zemi; b) v lesním podrostu; c) ve středních stromových patrech; d) vysoko v korunách stromů a ve vzduchu.

c) Předpokládáme, že druhy hledající potravu primárně na zemi budou díky zvýšenému kontaktu s půdou hostit v opeření více intenzivní mikrobiální společenstvo v porovnání s druhy hledající potravu ve vyšších keřových či stromových patrech.

D) Způsob hnízdění

Porovnávali jsme druhy hnízdící v otevřených a uzavřených hnízdech či dutinách.

d) Vzhledem k tomu, že mikrohabitatové podmínky uzavřených a dutinových hnízd jsou pro mikroorganismy vhodnější, předpokládáme, že druhy hnízdící primárně v uzavřených hnízdech a dutinách budou mít v opeření více intenzivní mikrocenózy v porovnání s druhy hnízdícími v otevřených hnízdech.

E) Pohlaví, stáří a pelichání jedince

e) Vzhledem k prokázaným pohlavním rozdílům v intenzitě mikrobiálního zatížení v opeření, které je obvykle výraznější u samic, očekáváme stejný či spíše méně výrazný efekt také pro tropické druhy ptáků, s ohledem na jejich reprodukční systémy a strategie.

f) Jelikož mikrobiom v peří juvenilních jedinců je více ovlivněn a determinován hnízdím mikrohabitem a sdíleným mikrobiomem rodičů, předpokládáme méně intenzivní mikrobiální společenstvo v peří juvenilních jedinců v porovnání s dospělci napříč druhy.

g) Jelikož pelichání je jedním z pravděpodobných mechanismů, kterými jedinci redukuje mikrobiom v opeření, předpokládáme méně intenzivní bakteriální zátěž v peří pelichajících jedinců v porovnání s nepelichajícími.

F) Úroveň melanizace krycího opeření

- h) Vzhledem k prokázaným rozdílům v mikrobiálním zatížení melanizovaného a nemelanizovaného opeření předpokládáme více intenzivní bakteriální zatížení v méně melanizovaném krycím opeření.

2. Druhým cílem diplomové práce bylo analyzovat souvislosti mezi potravními strategiemi, kvalitou pera odhadnutou na základě ptilochronologických parametrů a úrovní jeho melanizace na schopnosti pera odolávat bakteriální degradaci *in vitro* u tropických druhů ptáků. Konkrétně jsme testovali vliv těchto strategií a parametrů kvality pera na míru degradability rýdovacích per jednotlivých druhů:

G) Typ potravy, způsob sběru potravy a úroveň melanizace pera

- ch) Předpokládáme, že rýdovací pera druhů, které sbírají potravu na zemi a v keřovém podrostu trpí mnohem více mechanickým opotřebením, proto budou mít tyto druhy rýdovací pera více melanizovaná a tedy méně náchylná k bakteriální degradaci. Obecně předpokládáme, že více melanizovaná pera budou více rezistentní vůči bakteriální degradaci.

H) Rychlost růstu pera, „feather holes“ a kazové proužky („fault bars“)

- i) Jelikož existuje obecný předpoklad, že rychlejší růst pera negativně ovlivňuje jeho kvalitu ve smyslu celkové hmotnosti a strukturální kvality, předpokládáme, že rychleji narostlá pera budou mít více kazových proužků, budou celkově méně kvalitní a více náchylná k bakteriální degradaci.
- j) Poškození praporu pera ektoparazity se dá do jisté míry odhadnout na základě počtu FH, které však narušují a odhalují kortex a usnadňují průnik peří degradujícími mikroorganismům. Předpokládáme tedy, že počet FH bude pozitivně korelovat s intenzitou degradability pera keratinolytickými mikroorganismy. Kromě toho, obranná funkce melanizace pera byla v několika studiích naznačena i ve smyslu odolnosti pera vůči ektoparazitě způsobených perforací FH. Předpokládáme tedy, že více melanizovaná pera budou mít méně FH a budou lépe odolávat bakteriální degradaci.

3. Materiál a metodika

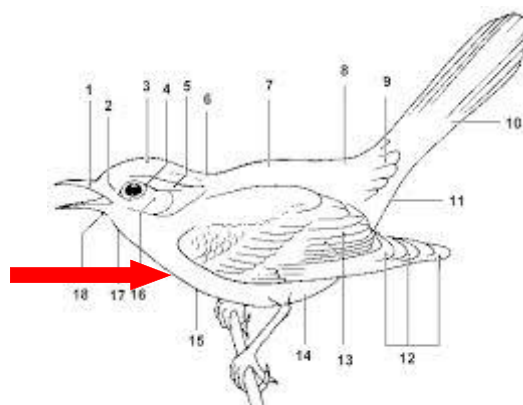
Lokalita odchytu cílových druhů ptáků

Odchyty cílových druhů ptáků byly realizovány v oblastech horského mlžného lesa 7 km od vesnice Big Babanki (6°07' 00" N, 10°15' 00" E) v Bamenda Highlands v severozápadním Kamerunu v období ledna-února 2012. Ptáci byly odchyťováni do nárazových sítí umístěných ve vhodném biotopu. Sítě byly pravidelně v půl hodinových intervalech kontrolovány. Poté bylo z odchytených jedinců v sítích odebráno obrysové a rýdovací peří.

Metodiky odchytu a odběru vzorků peří

3.2.1 Odběry obrysového peří na molekulární mikrobiologické analýzy

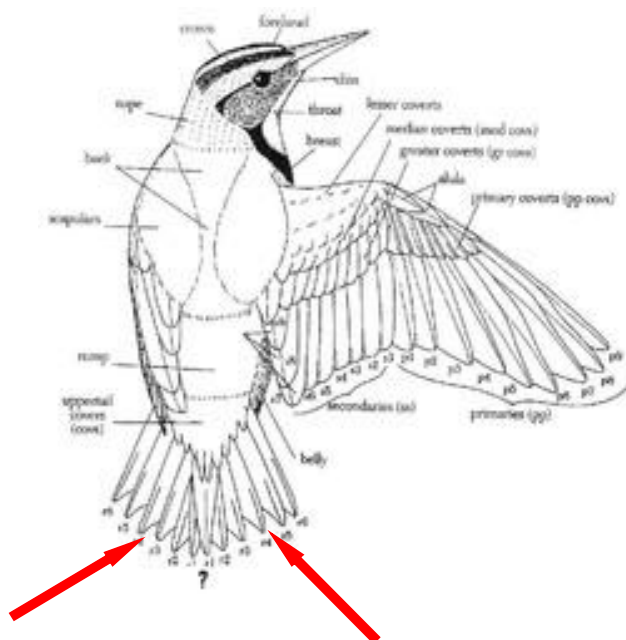
Z každého jedince, nacházejícího se ještě v nárazové síti (aby nedošlo ke kontaminaci peří v rukou kroužkovatele), byl pinzetou, která byla před každým odběrem sterilizována nad plamenem kapesního zapalovače, odebrán vytržením chomáček (cca 10) obrysových per z oblasti hrudi, jak je znázorněno na Obrázku 3, a vložen do 2ml sterilní zkumavky naplněné 1,5ml filtrovaného (bakterií-zbaveného) 70 % ethanolu. Tyto zkumavky byly po 4 týdnech dopraveny do ČR a uloženy do -20 °C až do doby izolace eubakteriální DNA z těchto vzorků.



Obrázek 3: Detail topografie odběrů krycích per

3.2.2 Odběr rýdovacích per a měření morfologických parametrů

Ze stejných jedinců, ale již po jejich vyjmutí z nárazové sítě byl odebrán 3. vnější pár rýdovacích per (detail odběru Obrázek 4). Obě rýdovací pera byla uložena do plastového zipovacího sáčku a pečlivě popsána. Tato pera byla následně dopravena do ČR a uložena na tmavém a suchém místě pro následné detailní ptilochronologické analýzy a analýzy úrovně melanizace, které jsou detailně popsány níže a sloužily pro stanovení parametrů rychlosti růstu pera a jeho kvality a obsahu melaninu. Po ptilochronologických analýzách byla rýdovací pera podrobena *in vitro* testování rychlosti degradability peří degradujícími bakteriemi, které je detailně popsáno níže, viz kapitola 3.6. Měření degradability rýdovacího peří.



Obrázek 4: Znárodněná rýdovací pera odebraná jedinci

Ptilochronologické zpracování rýdovacích per

3.3.1 Vážení a měření jednotlivých struktur pera

Veškeré manipulace s rýdovacími pery byly prováděny v gumových rukavicích, aby docházelo k co nejmenšímu ovlivnění a narušení původního stavu per. U každého z páru rýdovacích per bylo určeno, které rýdovací pero je levé a pravé a bylo zváženo s přesností na 0,01mg (váha KERN CM50-C2M). Dále byla změřena pomocí digitální šuplery (EDWIN 40348) celková délka pera, délka per bez brku s přesností na 0,01mm. Z těchto dvou veličin pak byla extrahována délka neopeřené části tedy pouze brku. Poslední

měřenou veličinou byla šířka brku, tedy jeho šířka přesně v místě hranice mezi opeřenou a neopeřenou částí, tedy u jeho báze („rhachis-calamus border“). Toto je velmi důležitý znak, který koreluje s kvalitou pera a schopností odolávat opotřebením (Weber a kol., 2005). Veškeré tyto změřené veličiny následně sloužily jednak jako dílčí veličiny ke vztahování úrovně degradability pera vzhledem na celkovou váhu pera a k výpočtům parametrů týkajících se kvality rýdovacího pera, které byly využity při statistických analýzách. Jejich konkrétní specifikace viz kapitola 3.6.5 Statistické zpracování dat.

3.3.2 Stanovení rychlosti růstu rýdovacího pera

Rychlost růstu pera je obecně považována za kovariátu jeho kvality. Rychleji rostoucí pero je většinou méně kvalitní, což se celkově deponované hmoty, ale i strukturální kvality týče (De La Hera a kol., 2009). Obecně je rychlost růstu pera vyjadřována pomocí veličiny GBW („growth bar width“), což je šířka úseku zahrnujícího většinou 8-11 růstových proužků a vydělena počtem měřených proužků. Čím je tato hodnota menší, tím pero rostlo rychleji a mělo by být méně kvalitní (Saino a kol., 2012) Jeden růstový proužek zahrnuje jeden světlý a jeden tmavý proužek napočítaný od špičky rýdovacího pera směrem k jeho bázi, tedy přírůstek délky pera během 24 hodin. V našem případě bylo GBW stanovováno tak, že bylo pero uloženo na tmavou podložku, kde byl jemnou tužkou zvýrazněn začátek prvního růstového proužku a konec 9. růstového proužku. Poté byla vyznačená vzdálenost mezi 1. a 9. růstovým proužkem změřena digitální šuplerou s přesností na 0,01 mm. GBW byla vyjádřena jako délka změřeného úseku / 9, tedy počtem měrných růstových proužků. Pokud bylo na peru viditelných méně proužků, byl zaznamenán jejich počet a změřená vzdálenost vydělená právě tímto počtem.

3.3.3 Kvantifikace „fault bars“ a „feather holes“ na rýdovacích perech

Počet FH, tedy drobných perforací v praporu pera, je považován jako hodnotný znak při určování infestace jedince ektoparazity perzistujících v peří a jeho poškození a kvality (Pap a kol., 2007; Vágási a kol., 2011). Rýdovací pera (L a P) byla rozdělena na pomyslné třetiny a zaznamenán počet FH. Detailní struktura FH je zobrazena na Obrázku 5 níže (Vas a kol., 2008). Počet FH byl zapsán pro 3 různé pomyslné třetiny pera (distální-ta blíže špičce pera, centrální a proximální – ta blíže bázi pera či brku). Jelikož ve finálních analýzách nebyl nalezen rozdíl či nějaký trend v lokalizaci FH, jako vysvětlující

proměnnou jsme ve statistických analýzách použili celkový počet FH detekovaných na konkrétním rýdovacím peru.



Obrázek 5: „Feather holes“ na ocasním peru vlaštovky obecné (Vas a kol., 2008)

Dále byl kvantifikován počet „fault bars“ tří různých kategorií (light – jen nepatrné prosvětlení díky chybějící větvi, medium – prosvětlení o šířce menší než 1mm, strong – prosvětlení širší než 1mm). Pro lepší demonstraci viz Obrázek 5 (Sarasola a Jovani, 2006). Toto vše bylo opět zaznamenáno ve třech pomyslných částech pera (distální, centrální a proximální). Zároveň bylo zaznamenáno, zda došlo a na jakém místě pera k ulomení části větvi díky přítomné „fault bars“. Ve statistických analýzách pro účely této diplomové práce byl použit jako vysvětlující proměnná pouze celkový počet „fault bars“, což je dostatečný ukazatel míry strukturálního poškození pera.

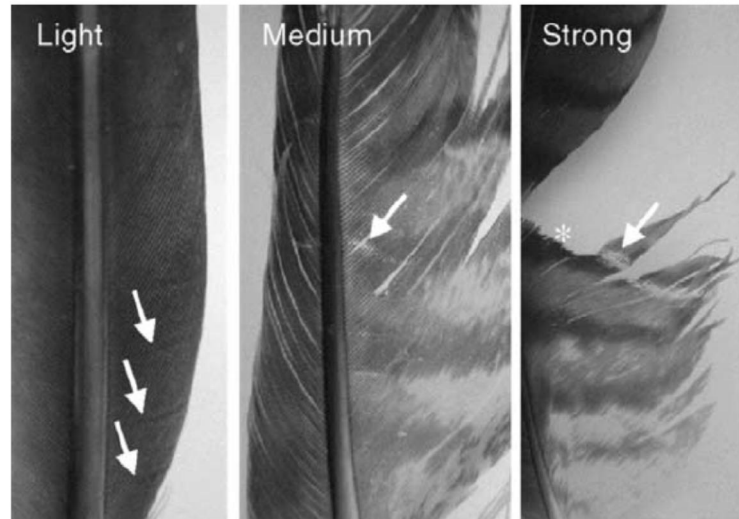


Fig. 1. A gradient of fault bar strengths found on the studied feathers. Arrows indicate fault bars. The asterisk indicates a break of feather barbules because of a strong fault bar.

Obrázek 6: Stupně poškození pera podle Sarasola a Jovani (2006)

3.3.4 Stanovení úrovně melanizace rýdovacích per

Abychom mohli posoudit vztah mezi stupněm melanizace rýdovacích per a rychlostí jejich *in vitro* degradace keratinolytickými bakteriemi, byla stanovena úroveň jejich melanizace následujícím způsobem. Od každého jedince byl nascanován pomocí scanneru Aficio MPC305sp (RICOH) levý i pravý rýdovák (viz Příloha 8.5 Obrázek: Znárodnění vybraných rýdovacích per testovaných druhů ptáků), který byl před scanováním z vnější strany, zatížen podložním sklíčkem. Nejprve bylo nutné převést pdf soubory na <http://convertonlinefree.com/PDFToJPGEN.aspx>. Analýza barev (konkrétně stupně šedé „gray scale“) probíhala ze scanů ve formátu jpeg, uložených jako 8-bit RGB, v programu ImageJ (freeware dostupný na: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Konkrétně bylo pomocí nástroje „Freehand selection“ vybráno a analyzováno pero jako objekt a pro každé pero tak byla změřena jeho plocha (mm²) a průměrná hodnota intenzity šedé („gray scale“), které sloužily k vyjádření podílu obsahu a intenzity deponace pigmentu melaninu do pera (Field a kol., 2013). Hodnoty „gray scale“ měly rozsah 0-255, kdy hodnota 0 vyjadřovala čistě černé pero a hodnota 255 zcela bílé pero (viz <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-28.html>; pro detailní metodiku). Tato metodika je běžně užívanou v mnoha biologických odvětvích a konkrétně pro stanovení úrovně melanizace byla nalezena silná korelace mezi hodnotami „grey scale“ a faktickou koncentrací melaninu v peru (např. Jawor a Breitwisch, 2003)

Molekulární analýzy intenzity a diverzity mikrobiálního společenstva v peří

3.4.1 Izolace bakteriální DNA

Veškeré izolace bakteriální DNA ze vzorků odebraného obrysového opeření a manipulace se vzorky i DNA probíhaly ve sterilním flow-boxu a za dodržení striktních sterilních podmínek, aby nedošlo k případným kontaminacím.

Izolace bakteriální DNA probíhaly s pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu RTP Bacteria DNA Mini kit (STRATEC) následujícím způsobem. Nejdříve byla ze zkumavky s obrysovým opeřením v lihu vyndána sterilně opálenou pinzetou veškerá peříčka a přenesena do Extraction tube. Poté byly zkumavky s lihem zcentrifugovány při intenzitě 14 000 rpm po dobu 20 minut na Eppendorf centrifuze (5424). Zkumavky po centrifugaci byly přemístěny do flow boxu, kde bylo velmi opatrně sterilní špičkou odebráno co nejvíce ethanolového supernatantu. Vždy bylo ponecháno cca 3-4 mm ethanolového supernatantu na dně a přebytečný ethanol byl poté ve flow-boxu odpařen s použitím termobloku. K peletě na dně bylo přidáno 200 μ l Resuspension buffer R. Vše bylo zvortexováno a veškerý obsah přepipetován do Extraction tube, ve které už byla přenesená peříčka.

Dálší postup izolace bakteriální DNA probíhal dle Protokolu 5 v podrobném manuálu izolačního kitu., viz Obrázek 7 pro detailní postup izolace bakteriální DNA. Vyizolovaná bakteriální DNA byla uložena v -20 °C až do doby následných qPCRanalýz. Peří, z kterých byla bakteriální DNA izolována, byla po izolaci uložena v mrazáku a dále zpracována pro zjištění jejich váhy a stanovení barevnosti, viz metodika 3.3.4. Stanovení úrovně melanizace rýdovacích per.

Protocol 5: Isolation of bacterial DNA from tissue biopsies

Please read protocols prior the start of the preparation and complete preparing steps!!

Attention: Please be aware, that you have to prepare the **Binding Buffer B6** – see instruction page: 10

Important note: Switch on heating blocks (e.g. thermomixer) to 56°C and 95 °C

1. Transfer 1 mg up to – max. 10 mg of the biopsy into the **Extraction Tube**.
Add 400 µl of **Resuspension Buffer R**. Close the cap and vortex shortly.
Place the **Extraction Tube** into a thermomixer and incubate under continuously shaking for 30 – 60 min minutes at 56°C. Lysis time can be increased if the lysis is not completely.
2. Place the **Extraction Tube** into a thermomixer and incubate at 95°C for 5 - 10 min (continuous shaking increases the lysis efficiency).
After lysis centrifuge the sample at max. speed for 1 minute to spin down unlysed material.
Transfer the supernatant completely into a 1.5 ml reaction tube (not provided).
3. Add 400 µl **Binding Buffer B6** to the sample and vortex shortly.
4. Load the sample onto the RTA Spin Filter Set and incubate for 1 min. Centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) in a standard table centrifuge for 2 min. Discard the filtrate and place the RTA Spin Filter back into the RTA Receiver Tube.
5. Add 500 µl **Wash Buffer I** and centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 1 min. Discard the filtrate, and the RTA Receiver Tube.
Place the RTA Spin Filter into a new RTA Receiver Tube
6. Add 600 µl **Wash Buffer II** and centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 1 min. Discard the filtrate. --
Place the RTA Spin Filter back into the RTA Spin Filter and finally centrifuge for 4 min at max. speed to remove the ethanol completely.
7. Place the RTA Spin Filter into a new 1.5 ml Receiver Tube and add 80 - 120 µl of **Elution Buffer** (depends on expected yield and wished concentration of DNA). Incubate for 1 min at room temperature.
Centrifuge for 1 min at 11.000 x g (11.000 rpm).

Note: The DNA can also be eluted with a lower volume of **Elution Buffer** (depends on the expected yield of bacterial DNA).

Obrázek 7. Protocol 5 (RTP® Bacteria DNA Mini Kit 0516 manuál, STRATEC)

3.4.2 qPCR kvantifikace PDB a eubakteriální DNA v peří

Pro kvantitativní stanovení kopií eubakteriální 16S rRNA ve vzorcích bakteriální DNA, izolované z obrysového opeření, byla použita metoda qPCR, založená na amplifikaci V1-V3 regionu 16S rRNA pomocí primerů 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') a 534R (5'- ATTACCGCGGCTGCTGG- 3') (Muyzer a kol., 1993). Tento pár primerů byl vybrán na základě optimalizačních pre-experimentů, ve kterých byla testována efektivita amplifikace se vzorky genomické bakteriální DNA izolované ze vzorků peří pomocí celkem osmi párů univerzálních eubakteriálních primerů pro 16S rRNA, viz Tabulka 1. Pro pár primerů 27 F a 357R byla efektivita amplifikace nejvyšší (slope = -3,457, efficiency = 94,7%) ve finální koncentraci primerů 160nM. Pro stanovení intenzity PDB byla využity páry primerů pro amplifikace kerA genů, které zodpovídají za keratinolytickou aktivitu bakterií (Lin a kol., 1995; viz Tabulka 3).

Tabulka 1: Páry primerů proeubakteriální 16S rRNA použité pro testování nejlepší efektivity qPCR

Název primeru	Sekvence oligo	Zdroj
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Muyzer a kol., 1993
534R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer a kol., 1994
EubaktNadF	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Nadkarni a kol., 2002
EubaktNadR	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Nadkarni a kol., 2002
EubaktAShaF	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	Shawkey a kol., 2007
EubaktCSHaF	GTGCCAGCCGCGCGGTAA	Shawkey a kol., 2007
EubaktShaR	GGTTACCTTGTTACGACTT	Shawkey a kol., 2007
EubaktLopF	CCTACGGGAGGCAGCAG	Lopéz-Gutiérrez a kol., 2004
EubaktLopR	ATTCCGCGGCTGGCA	Lopéz-Gutiérrez a kol., 2004
EubaktLaMonF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	LaMontagne a kol., 2002 + Liu a kol., 1994
EubaktLaMonAR	ACGGGCGGTGTGTAC	LaMontagne a kol., 2002
EubaktLaMonGR	ACGGGCGGTGTGTGC	LaMontagne a kol., 2002
EubaktLiuAR	CCGTCAATTCCTTTAAGTTT	Liu a kol., 1994
EubaktLiuGR	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Liu a kol., 1994

qPCR reakční směsi bylo použito SYBRGreen fluorescenční barvivo a komerčně dodávaný mastermix (KAPA SYBR® FAST Master Mix(2X); Elisabeth Pharmacon). PCR voda použitá v reakční směsi byla zcela bez přítomnosti bakteriální DNA (Microbial DNA-free water; Qiagen). 1 µl templátové DNA byl amplifikován v 15 µl reakční směsi, dle protokolu viz Tabulka 2.

Tabulka 2: Protokol pro namíchání 1 reakce (15 µl) qPCR reakční směsi

počet reakcí	1
2X KAPA SYBR® FAST qPCR	
Master Mix2	7.5
Primer F (10µM)	0.24
Primer R (10µM)	0.24
Templátová DNA	1
Microbial DNA-Free qPCR water	6.02
TOTAL volume	15

DNA i standard byly naneseny v duplikacích v devadesátišesti jamkových qPCR destičkách (Hard Shell 480 PCR plates, BioRad), které byly spolu s překrývací fólií (Biorad) vysvíceny 10 minut v UV cross-linkeru. Jako standard pro přesné absolutní vyjádření kopií PDB bylo využito bakteriální DNA izolované z 10^8 bakteriálních buněk *B. licheniformis* a *Pseudomonas aeruginosa*. Jako standard pro absolutní kvantifikaci ampliconů (kopií eubakteriální 16S rRNA) v templatové DNA ve vzorcích byl využit komerčně syntetizovaný gBlock fragment (IDT DNA Technologies) celého úseku genu pro 16S rRNA pro *Bacillus subtilis* (1555 bp; referenční sekvence, accession: NR_102783.1, GenBank-NCBI). Tato bakterie byla zvolena jednak pro známý počet genů 16S rRNA (Větrovský a Baldrián 2013), tak pro její poměrně vysoký podíl výskytu v peří ptáků. Díky použití gBlock fragmentu genu pro 16S rRNA této referenční bakterie jako standardu bylo minimalizováno riziko, že by absolutní počty kopií eubakteriální DNA ve vzorcích byly uměle nadhodnoceny či podhodnoceny. Po naředění lyofilizovaného gBlock fragmentu sterilním filtrovaným TE pufrům na koncentraci $10 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$, což odpovídá $5,868 \times 10^9$ počtu kopií, byla vytvořena diluční řada v rozmezí $5,68 \times 10^9 - 5,68 \times 10^1$. Amplifikace probíhala na qPCR platformě LightCycler 480 Roche, při tomto nastavení: pre-inkubace – 3 min 95°C ; amplifikace – 40 cyklů, 10 sec 95°C , annealing 25 sec 50°C , 1 sec 72°C ; melting curve – $97-65^\circ\text{C}$ 1 min (acquisition per 7°C); cooling – 10 sec 40°C .

Absolutní počet kopií ve vzorcích byl extrapolován pomocí sestavení externí standardní křivky z tří nezávislých qPCR běhů STD (repeatabilita pro 3 nezávislá STD opakování byla vysoká $R^2 = 0,93$) a spočítán v programu LightCycler 480 SW 1.5.

Při testování množství PDB ve vzorcích byl použit totožný postup jako při testování celkového množství bakterií v peří pouze za pomoci jiných primerů (Tabulka 3), tyto primery sloužily pro amplifikaci keratinolytických genů, které u PDB zodpovídají za jejich keratinolytickou funkci, ale nepodařilo se amplifikovat žádný takovýto gen. Jako pozitivní kontrola pro tyto analýzy sloužila DNA z *B. licheniformis* a *Pseudomonas aeruginosa*, jejichž DNA primery identifikovaly, čímž jsme si ověřili funkčnost metodiky i zvolených primerů. Důvodem našeho nulového výsledku s největší pravděpodobností bude nedostatečné množství specifické bakteriální DNA pro amplifikaci PDB v našich vzorcích.

Tabulka 3: Páry primerů pro PDB 16S rRNA použité pro testování nejlepší efektivity qPCR

název primeru PDB	sekvence
FP apr 1	TAYGGBTTCAAYTCCAAYAC
RP apr 2	VGCGATSGAMACRTTRCC
FP npr 1	GTDGAYGCHCAYTAYTAYGC
RP npr 2	ACMGCATGBGTYADYTCATG
FP sub 1	ATGSAYRTTRYAAAYATGAG
RP sub 2	GWGWHGCCATNGAYGTWC

Stanovení váhy a úrovně melanizace obrysových per

Barevné parametry krycího opeření byly analyzovány až po tom, co z něj byla vyizolována bakteriální DNA. Po izolaci byla krycí píčka 3x promyta a vortexována v 1ml destilované vody, aby byly odstraněny veškeré zbytky lyzačního pufru během izolace DNA. Takto promytá obrysová pera byla vysušena při 97 °C v termo-bloku a sušina per byla zvážena s přesností na 0,0001g (váha KERN CM50-C2M). Tyto hmotnosti sloužily k přepočtu množství kopií 16S rRNA zjištěné na základě qPCR analýz vyjádřené jako počet kopií 16S rRNA na 1mg krycího peří.

Po zvážení byla vždy 3 peříčka pomocí pinzety umístěna na podložní sklíčko, zatížena druhým podložním sklíčkem a krycí píčka byla nascanována. Analýzy intenzity melanizace krycích pírek, z kterých byla izolována bakteriální DNA, rovněž probíhaly v programu ImageJ (podrobné zpracování scanů krycích pírek probíhalo stejně jako bylo popsáno výše pro rýdovací pera, viz metodika 3.3.4. Stanovení melanizace rýdovacích per). Podobně jako u rýdovacích per byla měřena průměrná intenzita šedé, která sloužila k vyjádření podílu obsahu a intenzity deponace pigmentu melaninu do krycích pírek. Hodnoty pro 3 obrysová pera byly zprůměrovány. Průměrné hodnoty úrovně melanizace krycích per sloužila k výzkumu vztahu mezi celkovým bakteriálním zatížením opeření a jeho barevností.

Stanovení degradability rýdovacích per

Před experimentem bylo nutné si připravit glycerolové konzervy čisté kultury *Bacillus licheniformis* a namíchat a sterilizovat „feather“ médium a PBS pufr.

3.6.1 Příprava glycerolových konzerv *B. licheniformis*

Na TSA agar bylo vyseto 100 μ l rozředěného lyofilizátu typové kultury *B. licheniformis* zakoupené z CNCTC (CNCTC 7/79 6212). Misky byly následně inkubovány při 37°C v inkubátoru. Z 24 hodinové kultury byly narostlé čisté kolonie přeočkovány na šikmý agar a další kolonie přeočkovány do připraveného vyklávaného tekutého média (TSB; Sigma Aldrich 22092). Po 24 hodinách inkubace *B. licheniformis* v tekutém médiu byly narostlé buňky v TSB médiu naředěny do 10 kryozkumavek 1:1 se sterilním glycerolem a uloženy do -80°C. Tyto glycerolové konzervy pak sloužily k vysetí čisté kultury *B. licheniformis* v jednotlivých setech testujících míru degradability rýdovacích per.

3.6.2 Příprava „feather“ media

Na přípravu 100ml feather media bylo použito 100ml deionizované vody; 50mg NH₄Cl (9,34 mM NH₄Cl); 50 mg NaCl (8,55 mM NaCl); 30mg K₂HPO₄ (1,72 mM K₂ HPO₄); 39,7 mg KH₂PO₄ (2,92 mM KH₂ PO₄); 10 mg MgCl₂ x 6H₂O (0,49 mM MgCl₂- 6H₂O); 10mg yeast extract (0,01% yeast extract). Vše bylo dobře promícháno a dáno vyklávat na 15 minut při 121°C.

3.6.3 Příprava a provedení testu degradability rýdovacích per

Vždy bylo testováno jedno levé rýdovací pero z daného jedince (pokud byl vzorek jen s jedním rýdovacím perem, bylo použito to a dopsáno, zda se jednalo o levé či pravé pero). Aby bylo pero zbaveno jakékoliv iniciální mikrobioty před samotným experimentem bylo každé pero vloženo na 5 minut do UV „crosslinkeru“ (Uvitec CL 508), kde bylo takto z každé strany vysvíceno (celkem tedy bylo každé pero podrobno 10 minut UV o intenzitě 254 nm). Efekt UV záření na změny v degradabilitě rýdovacích per byl testován v pre-experimentu a bylo zjištěno, že dávka 10 minut dané intenzity UV degradabilitu pera nijak zásadně neovlivňuje a zároveň zbaví pero jakékoliv mikrobiální kontaminace. Celkem byla pera degradována v sedmi nezávislých opakováních po 40 vzorcích. Pera byla poté přemístěna do sterilních 7 ml skleněných zkumavek a do každé

zkumavky s pírkem bylo napipetováno 6 ml sterilního „feather“ média. Vždy do jedné zkumavky bez peří v daném setu bylo dáno jen 6ml „feather“ média, které sloužilo jako kontrola sterility „feather“ média a zároveň jako „BLANK“ kontrola při měření koncentrace oligopeptidů po degradačním experimentu. Poté bylo do každé zkumavky napipetováno 60 μ l inokula *B. licheniformis* v koncentraci $1,5 \times 10^8$ (CFU/ml), které bylo připraveno tak, že do skleněné zkumavky s modrým šroubovacím uzávěrem byly přidány 3 ml sterilního PBS a do něj 10 μ l kličkou přenesena přes noc narostlá kultura *B. licheniformis* na TSA vyseta den předem z glycerolové konzervy. Suspenze byla důkladně zvortexována a naředěna na požadovanou denzitu $1,5 \times 10^8$ dle McFarlandova standardu 0,5 (Thermo Fisher Scientific). Takto naředěná suspenze byla poté přeměřena při OD₆₀₀ v mikrotitrační destičce s U dnem ve spektrofotometru (TECAN), aby odpovídala hodnotě absorbance $OD_{600} = 0,05$ a byla tak kontrola, že v každém setu experimentů bylo inokulováno vždy suspenzí *B. licheniformis* o stejné hustotě bakteriálních buněk. Poté byly zkumavky zazátkovány sterilními vatovými zátkami a inkubovány při 37°C na orbitální třepače (BIOSAN) při 160 rpm po dobu 10 dní.

3.6.4 Analýzy oligopeptidů po degradačním experimentu

Dle předchozích studií je ideálním ukazatelem vyjadřujícím intenzitu degradace keratinu *B. licheniformis* naměřené koncentrace oligopeptidů v médiu, ve kterém bylo pero degradaci podrobena (Goldstein a kol., 2004). Po 10 dnech inkubace rýdovacích per byl po důkladném promíchání z každé skleněné zkumavky odebrán 1 ml suspenze do speciální zkumavek s minimální vazbou proteinů (Protein LoBind tubes; Eppendorf) a tato suspenze byla centrifugována při 14000 rpm 10 minut, aby sedimentovaly bakteriální buňky a nečistoty. Poté bylo napipetováno 25 μ l supernatantu v duplikacích do jamek mikrotitrační destičky s plochým dnem (BRAND). Do posledního řádku bylo naneseno 25 μ l BSA (bovine serum albumin) standardu připraveného dle instrukcí v kitu (Pierce™ BCA Protein Assay kit; Thermo Fisher Scientific; 23227; viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Postup přípravy BSA standardu pro měření množství oligopeptidů ve vzorcích

zkumavka	Množství PBS v μl	Množství BSA solution a zdroj [μl]	Finalní koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]
1.	125	375 of Stock BSA	1500 $\mu\text{g/mL}$
2.	200	200 zkum. 1	750 $\mu\text{g/mL}$
3.	700	100 Stock	250 $\mu\text{g/mL}$
4.	400	400 zkum. 3	125 $\mu\text{g/ml}$
5.	450	300 zkum. 4	50 $\mu\text{g/ml}$
6.	400	400 zkum. 5	25 $\mu\text{g/ml}$
7.	200	50 zkum. 5	10 $\mu\text{g/ml}$
8.	400	100 zkum. 6	5 $\mu\text{g/ml}$
9.	200	200 zkum. 8	2.5 $\mu\text{g/ml}$
10.	450	50 zkum. 7	1 $\mu\text{g/ml}$
11.	100	100 zkum.10	0.5 $\mu\text{g/ml}$
12.	200	0	BLANK

Poté byly ke vzorkům přidány roztoky dle instrukcí komerčního kitu. Ve zkratce, do každé jamky bylo nanášeno 200 μl WORKING SOLUTION. To bylo připraveno smícháním 50 dílů Reagent A s 1 dílem Reagent B (viz kit PierceTM BCA Protein Assay kit), poté byla mikrotitrační destička 30 sekund promíchána na třepače při 180 rpm, zakryta alobalem a inkubována 30 minut při 37 °C. Poté byla měřena absorbance při 562 nm na spektrofotometru (TECAN) při teplotě 24 °C. V každé mikrotitrační destičce byly rovněž měřeny hodnoty absorbance pro kontroly (PBS + čisté „feather“ medium bez peří po 10 dnech inkubace v 37 °C). Hodnoty koncentrace oligopeptidů ve vzorcích byly extrapolovány ze standardní křivky a zpracovány v programu GraphPad Prism 7.

3.6.5 Statistické zpracování dat

Pro studované druhy našich experimentů byl nejprve sestaven konsenzuální fylogenetický strom na základě 1000 bayesovských topologií získaných na <http://birdtree.org>. Konsenzuální fylogenetický strom (viz Příloha 8.1. Fylogenetický strom druhů) byl zkonstruován pomocí funkce consensus.edges z balíčku phytools. Hodnoty sledovaných znaků neboli vysvětlujících proměnných byly na strom vyneseny pomocí funkce countMap z balíčku phytools. Následně byla provedena analýza závislosti sledovaných znaků na vysvětlovaných proměnných pomocí Markov Chain Monte

project.org/web/packages/MCMCglmm/index.html). Modely předpokládaly normální rozdělení chyb a zohledňovaly fylogenetickou závislost znaků podle postupu popsaného ve studii Garamszegi (2014). MCMC simulace zahrnovaly 1 000 000 iterací, přičemž prvních 10 000 nebylo zahrnuto do výsledného odhadu parametrů. Pro odhad parametrů byla navíc použita každá pětistá iterace, aby se zamezilo problémům s autokorelací MCMC řetězce. Konvergence modelů byla posuzována vizuálně za použití standardních nástrojů. Na základě simulací byl rovněž odhadnut parametr Lambda, který sloužil k interpretaci závislosti daného znaku na fylogenezi studovaných druhů.

Pro každou z vysvětlovaných proměnných (intenzita bakteriální zátěže + rychlost degradability rýdovacích per) byly vytvořeny dva samostatné modely, které zohledňovaly jak mezidruhové rozdíly ve studovaných vysvětlovaných proměnných, tak jejich vnitrodruhovou variabilitu. Do vnitrodruhových modelů byly zahrnuty jak mezidruhové průměry, tak i vnitrodruhové odchylky od těchto průměrů. Vliv vnitrodruhové variability byl testován pouze u druhů, kde celkový počet jedinců na druh byl alespoň tři.

Pro modely testující změny v celkové bakteriální zátěži v krycím opeření tropických druhů ptáků ($N = 93$, druhy zahrnuty v datasetu pro tyto modely viz Příloha 8. 2. Tabulka 11) byly jako vysvětlující proměnné zahrnuty: habitat, potrava; typ sběru potravy, stáří jedince, pelichání a úroveň melanizace krycího opeření. Do modelů testujících rychlost degradability rýdovacích per tropických druhů ptáků na mezidruhové úrovni ($N = 274$; druhy zahrnuty v datasetu pro tyto modely viz Příloha 8. 3. Tabulka 12) byly jako vysvětlující proměnné zahrnuty: potrava; typ sběru potravy; úroveň melanizace rýdovacího pera, průměrný počet „fault bars“; průměrný počet FH a druhově specifická hmotnost těla („body mass“). Jelikož ptilochronologické ukazatele kvality a rychlosti růstu rýdovacích per (GBW = „growth bar width“ a tloušťka brku) byly silně pozitivně korelované s druhově specifickou „body mass“ (Spearman test, $t = 22,906$, $df = 272$, $p\text{-value} < 0,000$, $cor = 0,81$), použili jsme v mezidruhovém modelu jako vysvětlující proměnnou vyjadřující rychlost růstu a kvalitu rýdovacího pera pouze druhově specifickou „body mass“, zatímco v modelu testujícím vnitrodruhovou variabilitu v testovaných proměnných jsme použili rozdíly od druhově specifického průměru GBW.

Pro analýzy faktorů souvisejících s vysvětlovanou proměnnou úrovně melanizace rýdovacích per jsme použili rovněž MCMC modelů. Vysvětlujícími proměnnými pro tyto modely hodnotící čistě mezidruhové, tak i vnitrodruhové rozdíly ve vysvětlovaných proměnných a jejich efektu na melanizaci rýdovacích per byly:

potrava, typ sběru potravy, úroveň melanizace krycích per, GBW, počet FH a počet „fault bars“, „body mass“, stáří jedince a pelichání.

4. Výsledky

Intenzita bakteriální zátěže

Analýza dat odhalila, že celková bakteriální zátěž v krycím opeření nesouvisela s žádnou z testovaných vysvětlujících proměnných jak na mezidruhové úrovni, tak ani s vnitrodruhovou variabilitou těchto proměnných (viz Tabulka 5 a 6). Přestože v Grafu 1 můžeme pomocí „countmap“ vizualizace pozorovat nejnižší celkovou bakteriální zátěž v krycím opeření pro některé jedince druhů (*Nectarinia oritis*, *Campephaga petiti* a *Chloropeta natalensis*) a zároveň nevyšší bakteriální zátěž v krycím opeření druhů *Turtur tympanistria*, *Anropadus gracilirostris* a u některých jedinců druhu *Nectarinia preussi*, nenalezli jsme žádný druhově specifický trend v intenzitě bakteriální zátěže v krycím opeření. Toto potvrzuje i nízká hodnota lambda, která byla pro oba modely (vnitrodruhový: 0,082 i mezidruhový: 0,008) zanedbatelná, což poukazuje na nulový efekt fylogeneze studovaných druhů na celkovou bakteriální zátěž v krycím opeření. Podobně se celková intenzita bakteriální zátěže v krycím opeření u námi zkoumaných druhů neměnila v závislosti na barvě krycích per (Tabulka 5 a 6, Spearman cor.test: $t = 0,48455$, $df = 91$, $p\text{-value} = 0,6292$, $cor = 0,051$; Graf 2), na potravních strategiích (Graf 3) ani v závislosti na pohlaví (Graf 4) či stáří studovaných jedinců (Graf 5).

Tabulka 5: MCMC model pro mezidruhové rozdíly vlivu testovaných proměnných na celkovou intenzitu bakteriální zátěže v krycím opeření.

	mean	lowe 95% CI	upper 95%CI	eff.samp	p MCMC
Intercept	3.368956	0.407095	6.471945	1980	0.0283 *
Barva-krycí.mean	0.007238	-0.010945	0.025318	1980	0.4465
Pelichání	-0.149588	-0.828136	0.432183	2405	0.6556
Sběr potravy	-0.045335	-0.239928	0.153704	1980	0.6626
Potrava	0.079875	-0.120258	0.278778	2146	0.4434
Stáří jedince	-0.031350	-1.063986	0.792811	1980	0.9465

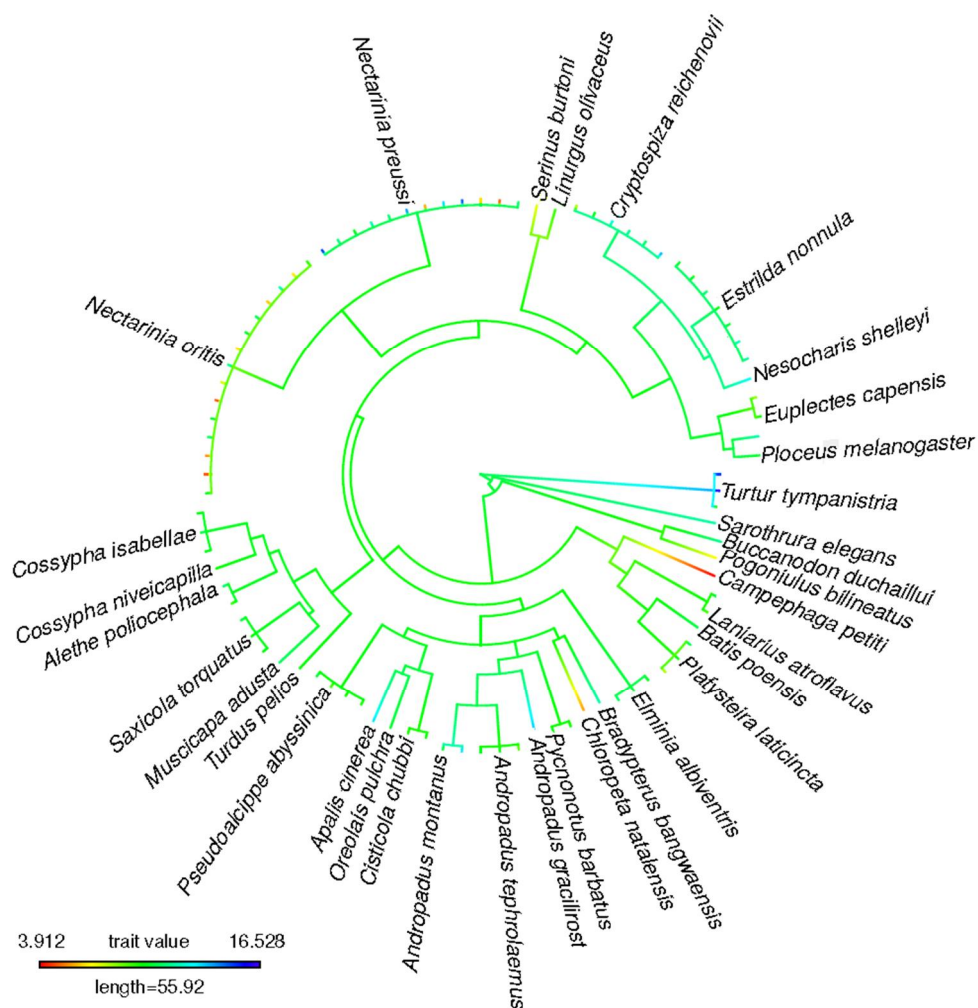
Lambda pro tento model: 0,008

Tabulka 6: MCMC model pro vnitrodruhové rozdíly vlivu testovaných proměnných na celkovou intenzitu bakteriální zátěže v krycím opeření.

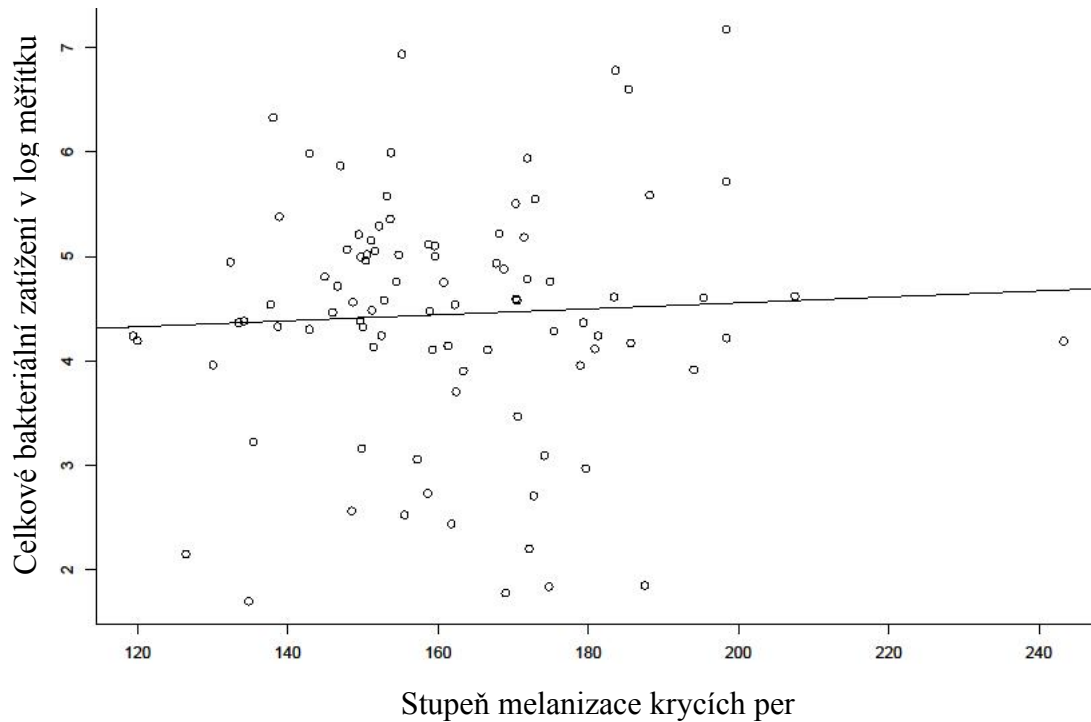
	mean	lowe 95% CI	upper 95%CI	eff.samp	p MCMC
Intercept	-3.107e+01	-1.491e+02	2.170e+02	1747	0.628
Barva-krycí.mean	2.185e-01	-1.399e+00	9.555e-01	1721	0.805
Pelichání	-5.821e-01	-1.702e+00	5.419e-01	1936	0.295
Barva-krycí, wihin	7.881e-03	-2.399e-02	4.269e-02	2134	0.635
Sběr potravy	1.107e+00	7.269e+00	6.830e+00	1711	0.756
Potrava	5.414e-01	-6.189e+00	7.352e+00	1980	0.686
Stáří jedince	-6.429e-01	-2.319e+00	1.273e+00	1980	0.477

Lambda pro tento model: 0,082

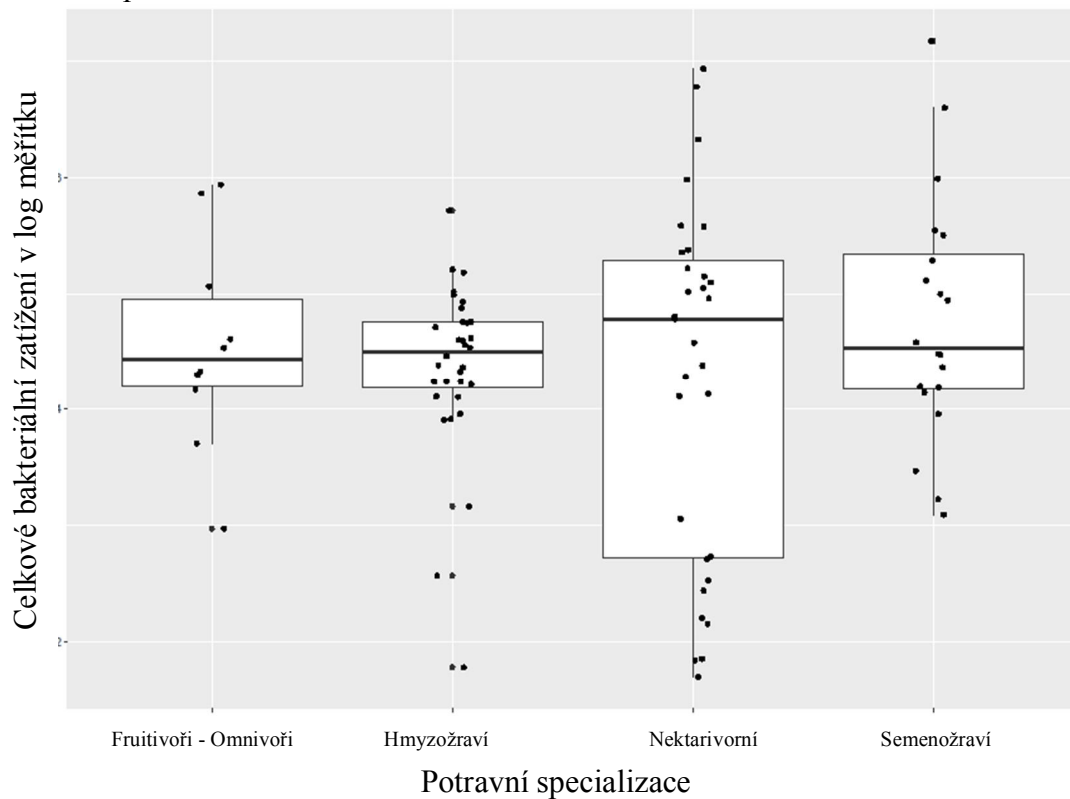
Graf 1: „Countmap“ grafické znázornění intenzit bakteriálního zatížení v opeření pro jednotlivé jedince cílových druhů, pro přehlednost jsou popsány pouze druhy v daných kladech. Intenzity jsou barevně odlišeny; červená-žlutá=nízká intenzita; zelená=střední intenzita; modrá-fialová=vysoké intenzity bakteriální zátěže



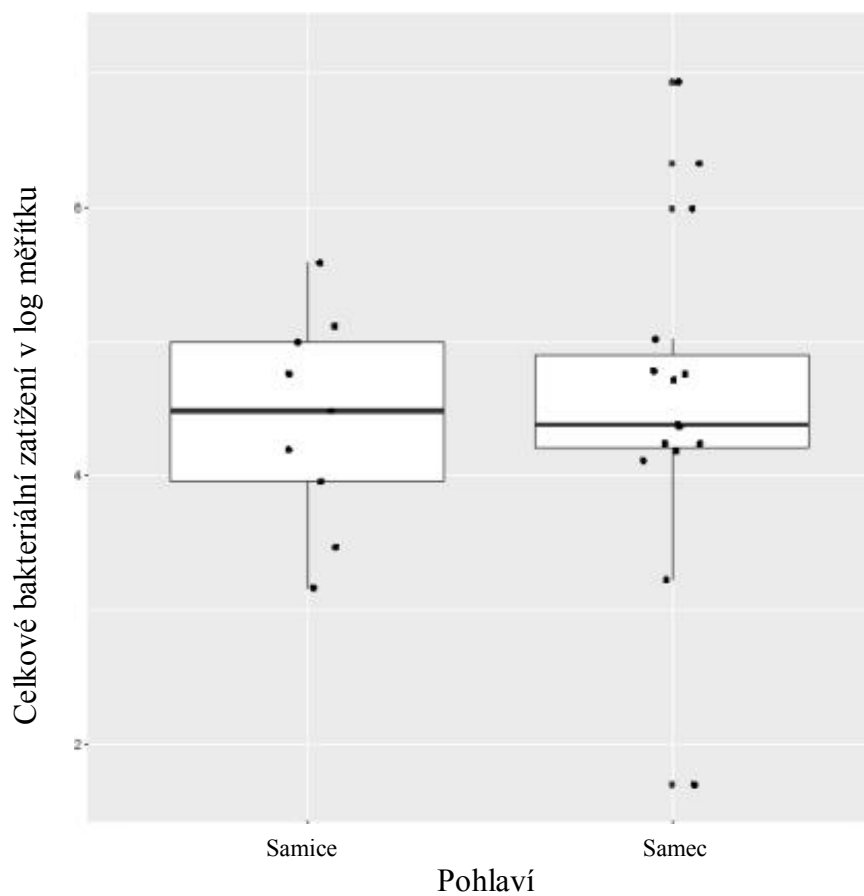
Graf 2: Vztah celkového bakteriálního zatížení a stupněm melanizace krycích per
 Poznámka: nižší hodnota na ose y znamená vyšší míru melanizace, (0 znamená černá melanizovaná pera)



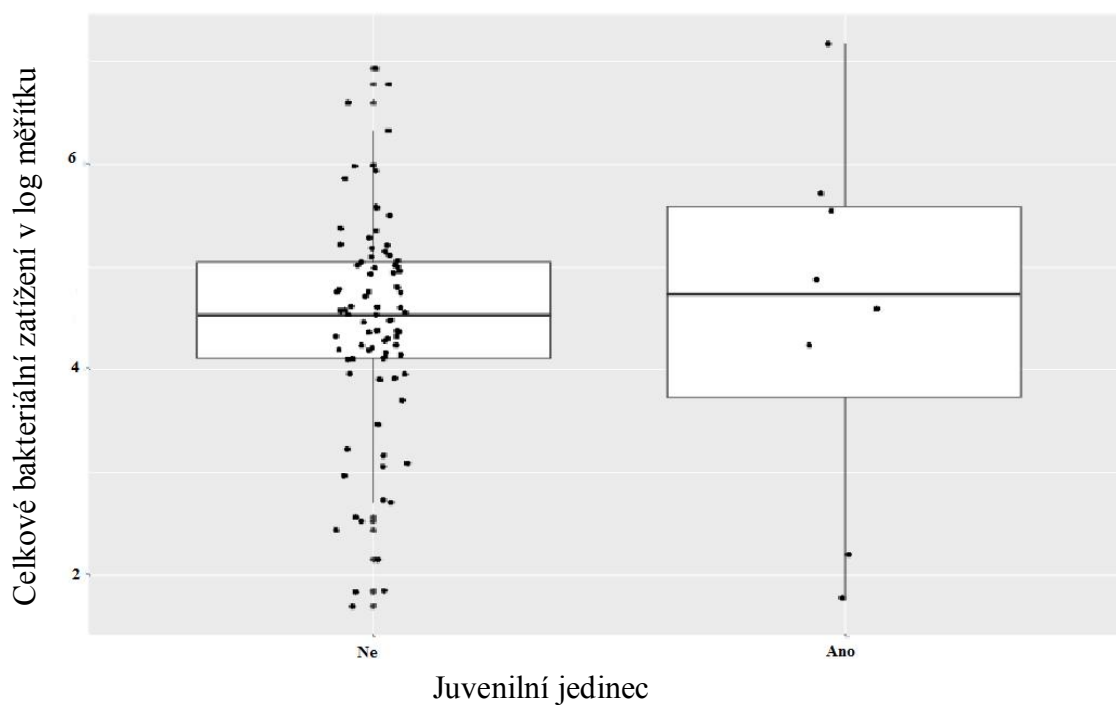
Graf 3: Rozdíly v intenzitě bakteriální zátěže v krycím opeření vzhledem k potravní specializaci



Graf 4: Rozdíly mezi celkovým bakteriálním zatížením a pohlavím jedince



Graf 5: Rozdíly mezi celkovým bakteriálním zatížením a stařím jedince



Rychlost degradability rýdovacích per

Zde jsme stejně jako při analýzách intenzity bakteriální zátěže hodnotili jak mezidruhové rozdíly ve sledovaných proměnných, tak jejich vnitrodruhovou variabilitu. Při použití celého datasetu, zahrnujícího rovněž druhy, pro které jsme měli pouze jedno pozorování, jsme nenalezli žádnou testovanou vysvětlující proměnnou, která by signifikantně ovlivňovala rychlost degradability rýdovacích per studovaných druhů (viz Tabulka 7). Nicméně v „countmap“ vizualizaci (Graf 6) můžeme vyčíst, že nejvíce bakteriální degradaci jednoznačně odolávala krycí pera druhů *Nectarinia oritis* a *Nectarinia preussi* z čeledi Nectarinidae. Pro tyto druhy, které jsou primárně nektarivorní byla rovněž pozorována nejnižší průměrná rychlost degradability oproti druhům s jinou potravní strategií (Graf 7) i když tyto rozdíly v efektu typu potravy nebyly v modelu signifikantní (Tabulka 7). Naproti tomu analýzy na redukovaném datasetu, který obsahoval nejméně tři jedince na druh a který byl zacílený na vnitrodruhovou variabilitu ve sledovaných proměnných, nám ukázaly negativní korelaci mezi vnitrodruhovou variabilitou v intenzitě melanického zbarvení a degradabilitou rýdovacích per viz Tabulka 8 a Graf 9. Více melanizovaná pera tedy degradovala pomaleji v porovnání s rýdovacími pery s méně intenzivním melanickým zbarvením. Tento signifikantní výsledek koresponduje i s faktem, že nektarivorní druhy, pro které jsme pozorovali nejnižší stupeň degradability měly zároveň, ač nesignifikantně, nejvíce melanizovaná rýdovací pera v porovnání s ostatními druhy s jinou potravní strategií (Graf 8). Hodnota lambda pro tyto dva modely byla 0,276 a 0,303232, což naznačuje mírnou závislost PDB indukovanou rychlostí degradability rýdovacích per na fylogenezi námi studovaných druhů.

Tabulka 7. MCMC model pro mezidruhové rozdíly v rychlosti degradability rýdovacích per (dataset pro všechny druhy i s pouze 1 jedincem na druh)

	mean	lowe 95% CI	upper 95%CI	eff.samp	p MCMC
Intercept	2.035557	-0.414608	4.551755	2216	0.110
F. holes-mean	0.025032	-0.075452	0.127162	2116	0.598
Fult bars-mean	-0.031148	-0.176674	0.115414	1450	0.698
Bdymass	0.027381	-0.008312	0.065708	1980	0.153
Potrava	-0.071829	-0.283400	0.121827	1743	0.484
Sběr potravy	-0.112033	-0.314339	0.094839	2173	0.272
Barva ryd. mean	0.007170	-0.012138	0.024995	2206	0.458

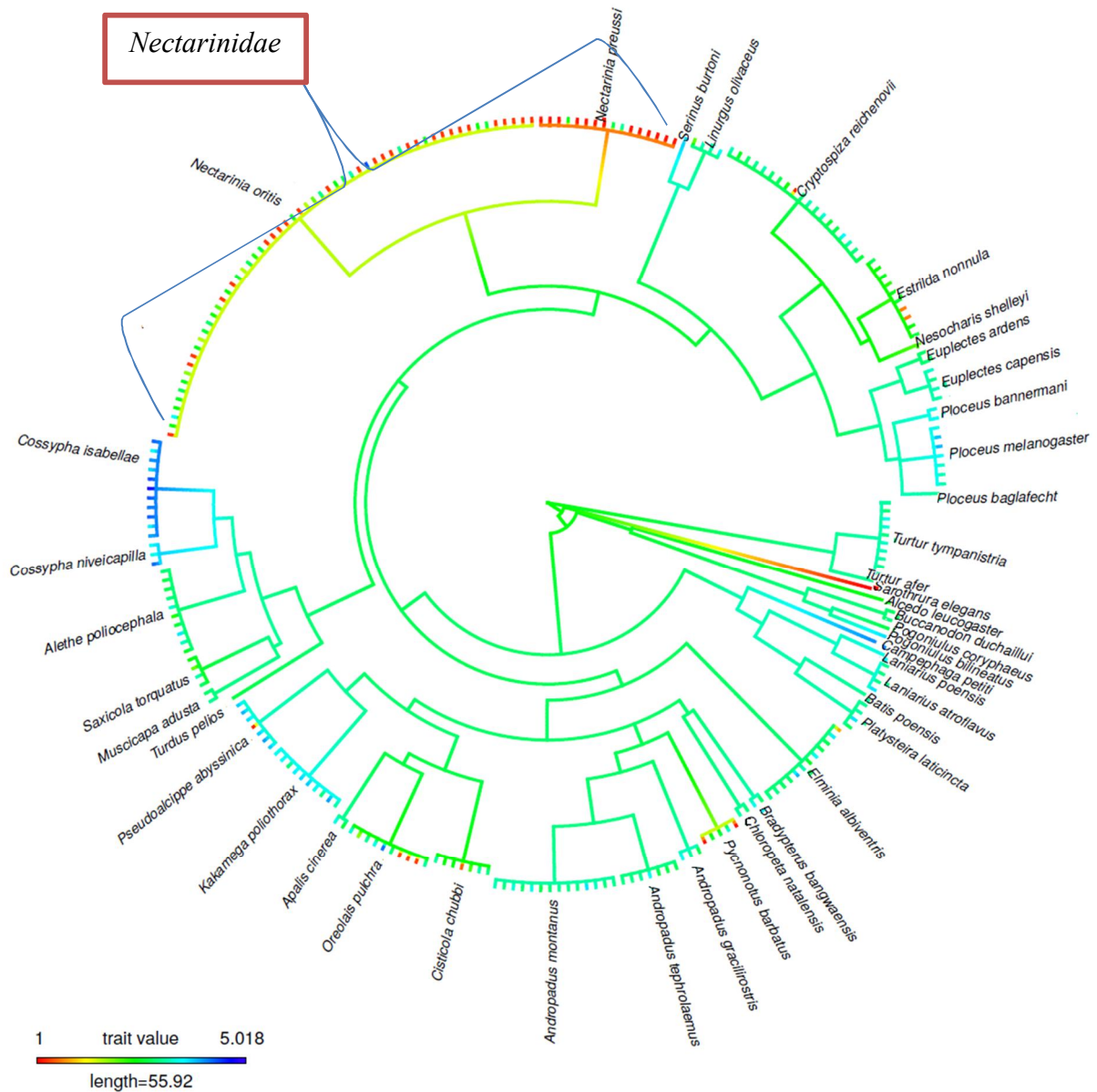
Lambda pro tento model: 0,303232

Tabulka 8. MCMC model pro mezidruhové i vnitrodruhové rozdíly v rychlosti degradability rýdovacích per (dataset obsahující pouze druhy, u kterých byly k dispozici více než 4 jedinci na druh)

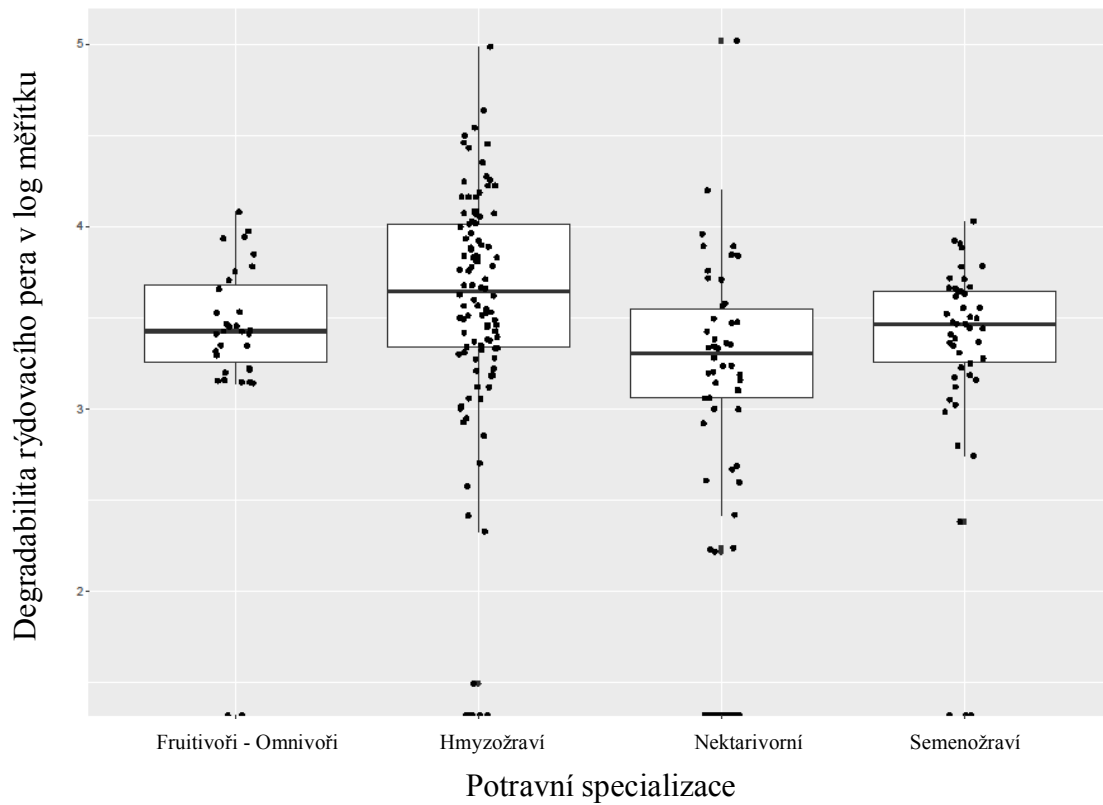
	mean	lowe 95% CI	upper 95%CI	eff.samp	p MCMC
Intercept	1.689672	-4.078584	7.888330	2017	0.5242
F. holes-mean	-0.001144	-0.203484	0.162864	1980	0.9970
Fault bars-mean	0.026786	-0.271377	0.325346	1980	0.8364
Bodymass	0.031116	-0.027431	0.095690	2413	0.2818
Potrava	-0.068057	-0.404162	0.255157	1404	0.6768
Sběr potravy	-0.076424	-0.428562	0.257580	2152	0.6374
Fault bars-within	0.003532	-0.040166	0.052854	1786	0.9222
F. holes-within	0.015967	-0.027882	0.053918	2208	0.4525
Barva ryd within	-0.023286	-0.043230	-0.000860	1980	0.0293 *
Barva ryd.mean	0.006955	-0.039942	0.048688	2099	0.7313
GBW.within	0.064945	-0.510860	0.586284	1841	0.8030

Lambda pro tento model: 0,303232

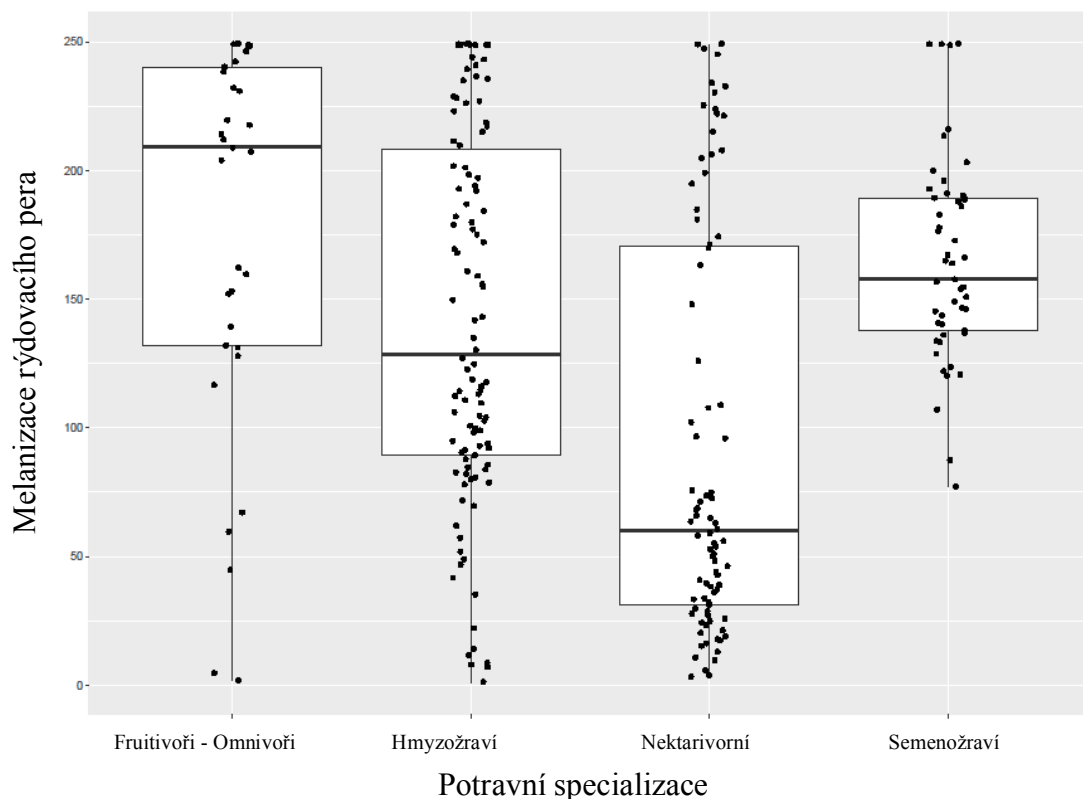
Graf 6. „Countmap“ grafické znázornění schopnosti odolávat bakteriální degradaci opeření pro jednotlivé jedince cílových druhů, pro přehlednost jsou popsány pouze druhy v daných kladech. Intenzity jsou barevně odlišeny; červená-žlutá= nízká míra degradability; zelená= střední míra degradability; modrá-fialová= vysoké míra degradability



Graf 7: Znázornění vztahu degradability rýdovacího pera a potravní specializace

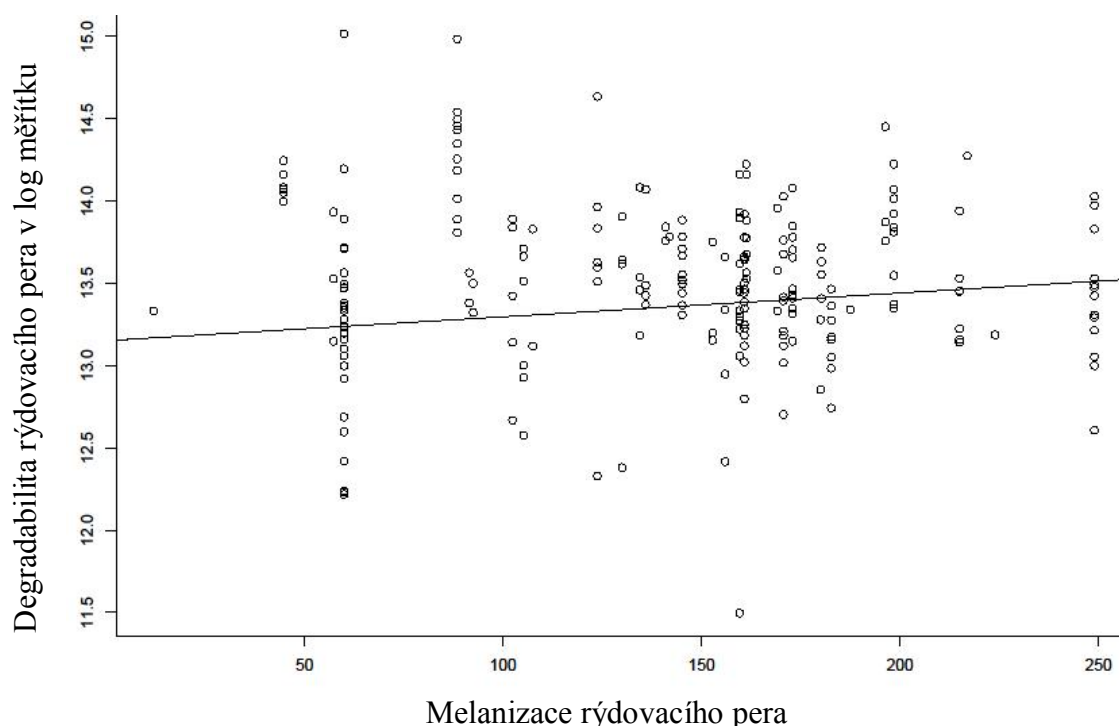


Graf 8: Znázornění vztahu mezi melanizací rýdovacího pera a potravní specializací
Poznámka: nižší hodnota na ose y znamená vyšší míru melanizace, (0 znamená černá melanizovaná pera)



Graf 9: Vztah mezi melanizací rýdovacího pera a jeho degradabilitou

Poznámka: nižší hodnota na ose x znamená vyšší míru melanizace, (0 znamená černá melanizovaná pera)



Faktory ovlivňující melanizaci rýdovacích per

Abychom navíc otestovali, jak námi studované faktory mohou souviset s úrovní melanizace rýdovacích per, provedli jsme dodatečnou analýzu pomocí MCMC modelů pro vybrané vysvětlující proměnné. V případě mezidruhových analýz zaměřených na variabilitu v melanizaci rýdovacího pera, kde byly zahrnuty i druhy s pouze jedním jedincem na druh, jsme neprokázali žádnou z testovaných proměnných jako signifikantní (Tabulka 9). Naopak v analýzách zaměřených na mezidruhovou i vnitrodruhovou variabilitu zahrnující tedy druhy s více než třemi jedinci na druh vyšel jako signifikantní efekt vnitrodruhové variability ve FH (Tabulka 10), tedy že více melanizovaná pera měla méně FH (Graf 10). Pozorovali jsme i průkazný efekt průměrné melanizace rýdovacího pera daného druhu na průměrný počet FH pro daný druh (Graf 11). Efekt typu potravy (Tabulka 10, Graf 8) a mezidruhové variability ve FH vyšel v tomto modelu slabě nesignifikantně (viz Tabulka 10). Lambda pro oba tyto dva modely byla 0,4868895 a 0,5812548, což poukazuje na střední závislost melanizace rýdovacích per na fylogenezi námi studovaných druhů.

Tabulka 9: MCMC model pro mezidruhové rozdíly v úrovni melanizace rýdovacích per (dataset obsahující všechny druhy)

	mean	lowe 95% CI	Upper 95%CI	eff.samp	p MCMC
Intercept	3.367647	0.168503	6.213682	2316	0.0323 *
Barva-kryci.mean	0.007161	-0.009938	0.025989	2169	0.4283
Pelichání	-0.140904	-0.803851	0.452635	1980	0.6434
Sběr potravy	-0.039650	-0.228827	0.160635	1980	0.7091
Potrava	0.081438	-0.123206	0.289295	1980	0.4253
Stáří jedince	-0.033079	-0.950884	0.827926	1768	0.9434

Lambda pro tento model: 0,4868895

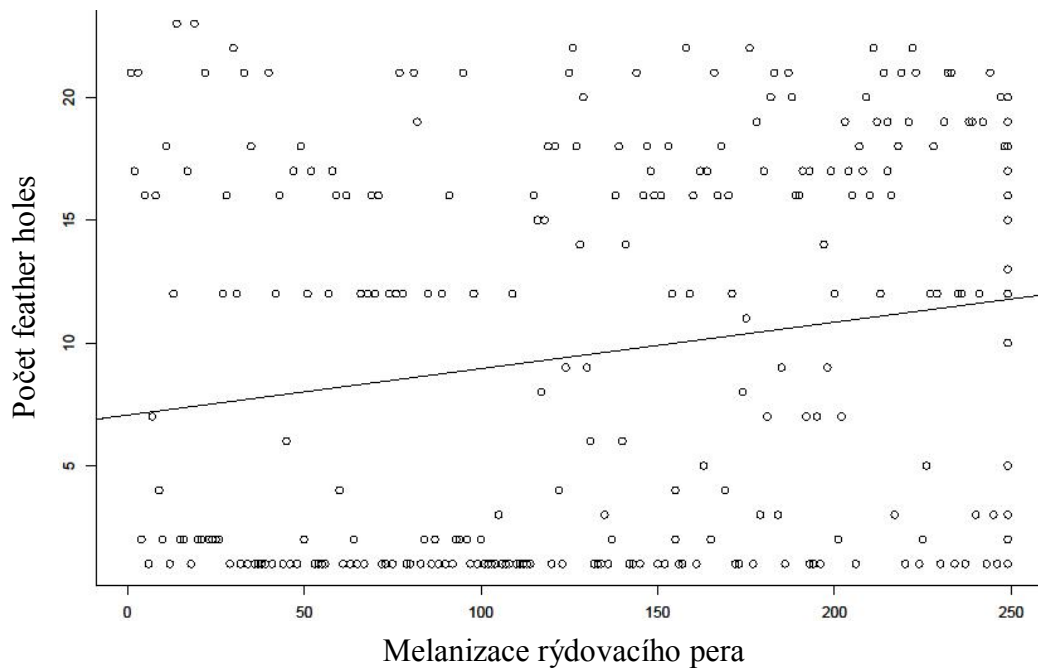
Tabulka 10: MCMC model pro mezidruhové i vnitrodruhové rozdíly v úrovni melanizace rýdovacích per (dataset obsahující pouze druhy, u kterých byly k dispozici více než 4 jedinci na druh)

	mean	lowe 95% CI	upper 95%CI	eff.samp	p MCMC
Intercept	129.040053	95.242775	157.950743	980.0	<0.001 **
f. holes mean	-2.220958	-4.918046	0.595023	980.0	0.1163
fault bars mean	-2.522158	-6.564939	2.227987	880.6	0.2143
Bodymass	0.037169	-1.035176	1.062039	980.0	0.9469
Potrava	-3.151568	-8.110155	2.387970	980.0	0.1735
sběr potravy	-0.149979	-6.057989	5.063245	802.6	0.9429
faultbars within	-0.006753	-0.467782	0.368024	872.7	0.9653
f. holes within	-0.396901	-0.781362	-0.067410	997.4	0.0306 *

Lambda pro tento model: 0,5812548

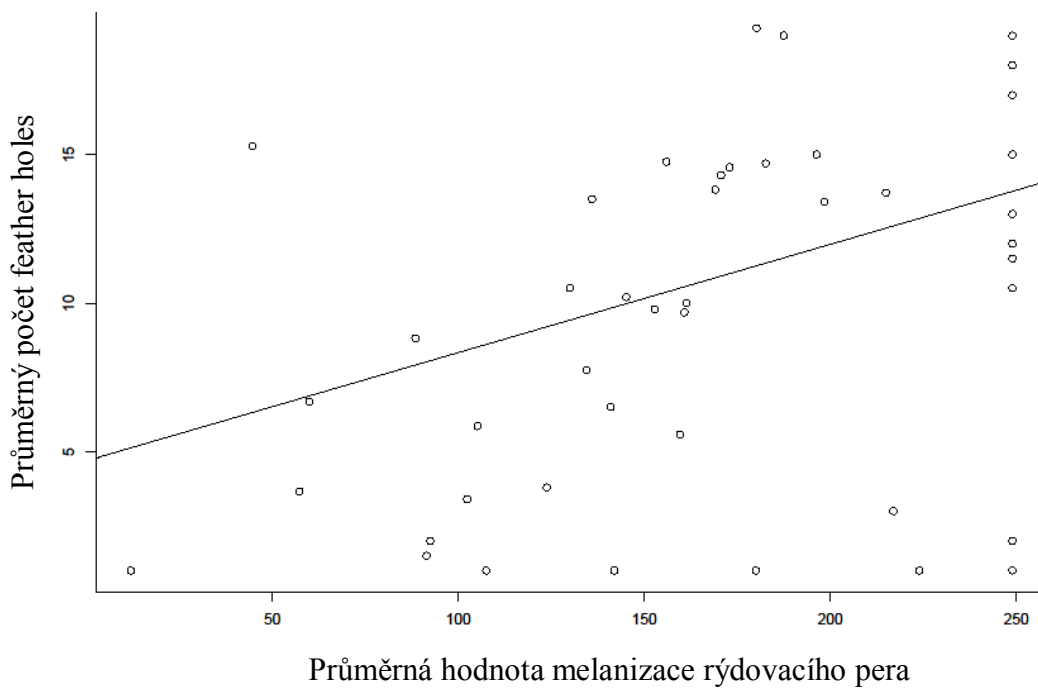
Graf 10: Korelace mezi melanizací rýdovacího pera a počtem „feather holes“

Poznámka: nižší hodnota na ose x znamená vyšší míru melanizace, (0 znamená černá melanizovaná pera)



Graf 11: Korelace mezi zprůměrovanými hodnotami melanizací rýdovacího pera a

průměrným počtem „feather holes“ Poznámka: nižší hodnota na ose x znamená vyšší míru melanizace, (0 znamená černá melanizovaná pera)



5. Diskuze

Celkové bakteriální zatížení peří

Při porovnávání intenzity celkové bakteriální zátěže u druhů obývajících oblasti tropického mlžného lesa v Kamerunu jsme nenalezli žádné rozdíly u druhů obývajících převážně lesní uzavřené biotopy a otevřené biotopy pastvin a lučin, což je v rozporu s předpokladem, že druhy uzavřených a více humidních lesních biotopů budou vykazovat intenzivnější mikrobiální zátěž v peří v porovnání s druhy otevřených a sušších stanovišť, který je podpořen několika studiemi (např. Burt a Ichida, 2004; Saag a kol., 2011b). Nicméně důvodů zapříčiňujících neprokázání efektu typu habitatu na celkovou bakteriální zátěž v opeření může být několik. Prvním z nich je, že jsme porovnávali pouze celková bakteriální zatížení peří a ta mohou být ovlivněna stochastickými faktory, jimiž mohou být nahodilé změny v prostředí či mikrohabitatové rozdíly (Soler a kol., 2012; Moreno-Rueda, 2011). Přestože u diverzity bakteriálního společenstva v peří se zdá, že hrají roli také faktory deterministické, jako je například náležitost k druhu. Celkové bakteriální zatížení peří se může měnit na úrovni jedince a vzhledem k jeho konkrétní kondici. Toto lze pozorovat i v našich datech, kdy uvnitř druhu lze sledovat jak jedince s vysokými, tak i s velmi nízkými intenzitami bakteriální zátěže (viz Příloha 8.4. „Countmap“), poukazujícími na fakt, že množství bakterií v peří je více ovlivněno nahodilými faktory a není determinováno příslušností jedince k druhu či konkrétním životním strategiím. Některé studie nacházejí vliv individuálních faktorů jako je kondice jedince (Leclaire a kol., 2015) či velikost uropygiální žlázy (Czirják a kol., 2013) na množství celkového bakteriálního zatížení peří. Tyto individuální faktory mohou hrát velmi zásadní roli v regulaci celkového bakteriálního společenstva v opeření. Například u vrabců domácích *Passer domesticus* bylo prokázáno, že odstraněním uropygiální žlázy vzrostlo celkové množství bakterií v peří (Czirják a kol., 2013). Silný vliv na bakteriální společenstvo má i prostředí, ve kterém se jedinec momentálně nachází, což bylo dokázáno u pozorování bakteriálního společenstva v uropygiální žláze ptáků. To je ovlivněno hnízdním materiálem, v kterém se jedinec nachází a také přenosem bakterií z rodičů, u hnízdicích samic se dokonce lišilo v porovnání prvního a pak následného hnízdního období (Ruiz - Rodríguez a kol., 2014). Stejnými faktory může být ovlivněno i celkové bakteriální zatížení v peří, což je ovšem zatím neprozkoumané téma.

Důvodem může být i to, že dosud existující studie prokazující tento trend hodnotí většinou rozdíly na populacích pouze jednoho druhu. Mezdruhových studií je velmi málo, např. Saag a kol. (2011b) porovnávali lesjka černohlavého a sýkoru koňadru žijící na stejném území a živící se podobnou potravou. Zjistili rozdílné množství bakterií v jejich opeření. Tato studie je ale svým charakterem výjimečná a nelze z ní tedy vyvodit obecný trend, navíc u tropických druhů mohou platit zcela jiné zákonitosti. Druhým důvodem je, že v naší studii se lokality horského mlžného lesa se svými environmentálními podmínkami příliš nelišily. Dále je nutné podotknout, že dataset nebyl dostatečně robustní, aby se nám prokázaly rozdíly malých niancí.

Podobně potravní specializace neměla žádný vliv na celkovou bakteriální zátěž v opeření studovaných druhů. Přestože jsme se domnívali, že nejmenší mikrobiální zatížení v peří budou nést nektarivorní druhy, což by korespondovalo s rozsáhlejší studií týkající se PDB (Kent a Burt, 2016), kde byl tento předpoklad pro intenzity PDB prokázán, na základě našich dat se nepodařila tato hypotéza prokázat. Bohužel není dostatek srovnávacích studií, s kterými bysme mohli naše výstupy diskutovat vyjma jediné (Kent a Burt, 2016), která byla ovšem zaměřena pouze na sledování incidence a frekvence výskytu PDB. My jsme hodnotili intenzity bakteriální zátěže zahrnující celá bakteriální společenstva, která mohou, zvláště u tropických druhů ptáků podléhat zcela jiným vlivům determinujícím jak intenzitu, tak diverzitu bakteriální zátěže v opeření.

U námi studovaných druhů se nepodařilo detekovat molekulárními metodami intenzitu zatížení peří PDB, což může být způsobeno několika faktory. Jedním z nich je fakt, že studie, kde množství PDB v peří detekovali, byly prováděné čistě kultivačními metodami (Burt a Ichida, 1999). Námi použitá molekulární metodika má své limity závislé na kvalitě izolované bakteriální DNA, která u vzorků opeření uložených v ethanolu nebyla optimální. Dalším možným důvodem je fakt, že incidence PDB byla v opeření studovaných druhů natolik nízká, že koncentrace z nich izolované DNA byly na tak malé úrovni, že neumožnily amplifikaci cílových markerů pro keratinolytické geny. Zároveň z nejnovější publikované studie je zřejmé, že PDB nebyly spolehlivě detekovány u všech druhů ptáků. Incidence PDB mezi druhy uvedená v zatím největší srovnávací studii je 39 % (Kent a Burt, 2016). Je tedy možné, že naše testované druhy PDB v peří neměly, či jejich abundance byly tak nízké, že nemohly být kvantifikovatelné.

Ve výsledcích srovnávajících celkové bakteriální zatížení opeření a vliv typu sběru potravy u studovaných druhů jsme rovněž nenalezli žádný rozdíl. Náš předpoklad, podložený prvotní studií o bakteriích v peří zejména PDB říká, že největším zdrojem pro

infekci ptáka je půda, kde se hojně vyskytují bakterie jako je např. *Bacillus* spp. (Burt a Ichida, 1999), zněl tak, že druhy sbírající potravu na zemi budou mít bakteriální zátěž nejvyšší. To se ovšem na základě našich dat prokázat nepodařilo. Pro celkové bakteriální společenstvo v peří mohou platit úplně jiné zákonitosti, které jsou zatím neobjasněné.

Společenstvo mikroorganismů v opeření ptáků se mění v různých typech hnízdního prostředí (Goodenough a Stallwood, 2010; Ruiz-de-Castañeda a kol., 2011; Peralta-Sánchez a kol., 2012). Peralta-Sánchez a kol. (2012) zkoumali mezidruhové rozdíly v bakteriálním zatížení ptáků a poukázali na to, že typ hnízda, použití peří nebo zelených rostlin v hnízdě vysvětluje výrazné odlišnosti bakteriálního společenstva v hnízdě. Výskyt těchto mezidruhových rozdílů v intenzitě zatížení bakteriálním společenstvím v hnízdě může silně záviset na konkrétních podmínkách hnízdního prostředí, ale u tropických druhů se nepodařilo rozdíl mezi dutinovými ptáky a ptáky otevřených hnízd prokázat, a to zejména z důvodu obtížnosti určení, zda se jedná o hnízdící jedince či nikoli. Mnoho druhů tropických ptáků, a to i některé námi studované druhy, mohou zahnízdit v průběhu celého roku a typické hnízdní období se u nich obtížně odhaduje. Z edice knih o Afrických druzích (Brown a kol., 1982) jsme vyextrahovali informace ohledně našich zkoumaných druhů a zjistili, že většina z nich má období kladení vajec v jiných měsících, než byl prováděn odchyt. Lze tedy říci, že s největší pravděpodobností byla většina odchycených jedinců mimo hnízdní období, což je důvodem pro nemožnost prokázání efektu typu hnízdění, protože ptáci ve svém opeření nenesli projevy determinované právě mikrohabitatem hnízda.

Úroveň melanizace krycího opeření nám neodhalila mezidruhové ani vnitrodruhové rozdíly v intenzitě bakteriálního zatížení peří. Stejně tak jsme v datech nenalezli podporu pro efekt faktorů pohlaví, stáří jedince a pelichání a to díky nedostatečně robustnímu datasetu. Testování těchto faktorů bylo dodatečné a z výsledků nelze vyvozovat obecné závěry. Efekt fylogeneze na intenzitu bakteriální zátěže vyšel téměř nulový, čemuž nasvědčuje neprokázání signifikantních efektů pro testované faktory. Hodnota lambda nám vypovídá o nulovém efektu fylogeneze a podporuje tvrzení, že celkové bakteriální zatížení peří je s velkou pravděpodobností determinováno více stochasticky než životními strategiemi. To však nemusí platit pro diverzitu bakteriálního společenstva, kterou jsme nezvládli do předložené práce zakomponovat, ale její provedení plánujeme a očekáváme zamavé výsledky.

Degradabilita rýdovacích per

Při porovnávání faktorů souvisejících se schopností pera odolávat bakteriální degradaci *in vitro*, jsme část svých hypotéz potvrdili a část z různých důvodů neprokázali. Náš obecný předpoklad, že více melanizovaná pera budou více rezistentní vůči bakteriální degradaci, byl potvrzen, a to dokonce na vnitrodruhové úrovni. Degradabilitu per odchycených jedinců jsme otestovali tak, že jsme k rýdovacímu peru přidali nakultivovaný kmen *B. licheniformis*, který patří mezi běžný a hojně se vyskytující druh mikroorganismů v peří ptáků (Burt a Ichida, 1999; Lucas a kol., 2003). Pro naši studii bylo důležité, že prosperuje odlišně na různě barevném peří (Goldstein a kol., 2004; Grande a kol., 2004; Gunderson a kol., 2008). Goldstein a kol. (2004) demonstrovali větší degradabilitu *B. licheniformis* bílého peří, které má absenci melaninu, ale Grande a kol. (2004) došli k opačnému výsledku. Gunderson a kol. (2008) zopakovali tyto experimenty a z jejich závěru vyplývá, že bílé nemelanizované peří podléhá bakteriální degradaci snáze. Prokázaný vliv melanizace jako ochrany před bakteriální degradací můžeme také vidět na studii zkoumající lejska černohlavého *Ficedula hypoleuca*, kdy jeho bílé nemelanizované skvrny na peří křídel byly více náchylné k degradaci PDB (Ruiz-de-Castañeda a kol., 2011). Naše výsledky se shodují jinými studiemi (např. zmiňovaný Gunderson a kol., 2008; Ruiz-de-Castañeda a kol., 2011) a také jsme prokázali, že více degradovalo peří jedinců, jejichž opeření je méně melanizované. Velmi silný byl tento ochranný efekt melanizace rýdovacího pera na úroveň jeho bakteriální degradace pro strdimily, což jsou ptačí nektarivorní specialisté. U těchto druhů docházelo v naší studii k nejnižší degradaci rýdovacích per. Důvodem může být iridiscentní zbarvení, které tyto ptáci mají (Prum, 2006). To je způsobeno mikrostrukturální stavbou pera (Shawkey a Hill, 2006). Domníváme se, že jejich extrémně iridiscentní opeření je nutné udržovat v kondici. K tomu strdimilové, stejně jako jiné druhy, používají roztírání sekretů uropygiální žlázy. Ta je u strdimilů relativně k velikosti těla nadrozměrně velká (vlastní pozorování). Vzhledem k obranné funkci uropygiálních sekretů proti PDB (Giraudeau a kol., 2010) je pravděpodobné, že takto intenzivně ošetřené rýdovací pero sekrety uropygiální žlázy odolávalo bakteriální degradaci lépe, a kromě udržování iridiscentního zbarvení tak mohou uropygiální sekrety těchto druhů sloužit obecně k ochraně proti ektoparazitům v opeření. Druhým vysvětlením je, že tyto mikrostruktury způsobující iridiscentní zbarvení jsou velmi subtilní s velkou pravděpodobností degradovaly jako první. Samotné větve pera tak mohly být mikrostrukturami chráněny před degradací a

podléhalo jí později než neiridiscentní pero. Nejpravděpodobnějším důvodem pro vysokou rezistenci rýdovacích per strdimilů vůči bakteriální degradaci však byla jeho vysoká úroveň melanizace. Z výsledků je patrný trend nejnižší degradability rýdovacích per u nejvíce melanizovaných per, která v naší studii měly právě nektarivorní druhy. Přestože jsme u efektu potravní specializace studovaných druhů nenalezli signifikantní efekt na úroveň degradace opeření, dá se říci, že zkoumaní nektarivoři mají nejvíce melanizované opeření a to nejvíce odolává bakteriálnímu rozkladu.

Výsledky srovnávající typ sběru potravy studovaných druhů neodpovídají našemu předpokladu, že druhy, které sbírají potravu na zemi a v keřovém podrostu, trpí více mechanickým opotřebením, proto budou mít rýdovací pera více melanizovaná, tedy méně náchylná k bakteriální degradaci. Nejméně náchylná pera k bakteriální degradaci vykazovaly nektarivorní druhy, které jsou jedny z nejvíce specializovaných a zároveň i jejich sběr potravy, kdy poletují mezi vegetací bez kontaktu se zemí, odpovídá naopak menší pravděpodobnosti, že u jejich rýdovacích per dojde k mechanickému opotřebením. I přesto patří nektarivorní druhy v naší studii mezi nejvíce melanizované. Přestože úroveň melanizace jejich rýdovacích per s největší pravděpodobností chrání pero před bakteriální degradací, vzhledem k prokázanému nízkému výskytu PDB v opeření nektarivorních druhů (Burt a Kent, 2016) nelze, s největší pravděpodobností, mikroorganismy nacházející se v opeření či potravní strategii považovat za hlavní selekční faktory související s melanizací rýdovacích per strdimilů.

Dále jsme se zaměřili na rychlost degradace per s ohledem na jejich kvalitu a poškození. Rychlejší růst pera by měl podle obecného předpokladu negativně ovlivňovat kvalitu pera (De la Hera a kol., 2009; Saino a kol., 2012), čímž myslíme celkovou hmotnost, v čemž se naše výsledky shodují a našli jsme silnou pozitivní korelaci mezi rychlostí růstu pera a jeho váhou. Proto jsme použili jako parametr kvality pera právě rychlost jeho růstu neboli parametr GBW. Rychleji narostlá pera by měla mít více kazových proužků, a být celkově méně kvalitní (Saino a kol., 2012), tím pádem podléhat snáze degradaci bakteriemi. Tento předpoklad se nám bohužel nepotvrdil z důvodu, že tato strukturální narušení pera velmi pravděpodobně spíše ovlivňují jeho mechanické a fyzikální schopnosti a také mohlo dojít k překrytí jejich efektu průkazným efektem melanizace, která hrála v naší studii významnou roli a chránila pero proti degradaci.

Melanizace hrála také roli v množství FH, což je jeden z dalších ukazatelů poškození pera. Jejich počet by měl pozitivně korelovat s intenzitou degradability pera keratinolytickými mikroorganismy, protože obranná funkce melanizace pera byla

v několika studiích naznačena i ve smyslu odolnosti pera vůči ektoparazitě způsobených perforací (FH) (Bush a kol., 2006; Vágási a kol., 2014). Ektoparaziti narušují a odhalují kortex pera a usnadňují průnik peří degradujícím mikroorganismům. Analýzy faktorů zodpovídajících za úroveň melanizace opeření prokázala, že, více melanizovaná pera měla méně FH, což by znamenalo, že melanizace slouží jako ochrana před vznikem FH. Lze tedy říci, že deponace melaninů je jeden z používaných mechanismů sloužících k ochraně peří proti degradaci peří, proti působení ektoparazitů jako jsou všenkyně, PDB a bakteriím obecně. Naše data o tropických druzích toto tvrzení potvrzují, navzdory tomu, že náš předpoklad, že víc FH bude znamenat vyšší degradabilitu, jsme neprokázali.

Důležitým mechanismem, který je považován za ochranu proti PDB je roztírání sekretů uropygiální žlázy do peří. U našich druhů nemáme bohužel data o velikosti uropygiální žlázy či složení jejích sekretů, ale je důležité ji zmínit a to i z hlediska FH, na které má nejspíše také vliv, protože její sekrety působí nejen jako ochrana proti bakteriím, ale i všenkám. Ty, jak bylo zmíněno v kapitole 1.3., mohou být příčinou vzniku FH. Jejich větší počet byl nalezen na bílých částech ocasních per vlaštovky obecné (Moller, 1991; Kose a kol., 1999). Domníváme, se tedy že melanizace by mohla mít ochrannou funkci také před perforováním pera všenkami. Ale Bush a kol. (2006) ve své studii testovali roli melaninu jako možné ochrany proti všenkám u holubů skalních (*Columba livia*) a žádný z jejich testů nepotvrdil naši domněnku. Zdá se tedy, že deponace melaninu nemá žádný vliv na všenkyně, alespoň v případě holubů skalních. V naší studii, kde jsme uvažovali také množství FH a zároveň zaznamenali melanizaci pera, nám však tento vztah vyšel signifikantně jak na vnitrodruhové, tak i mezidruhové úrovni, z čehož vyplývá, že více melanizované pero má méně FH. Dalo by se tedy říci, že všenkyně reagují na množství melaninu v peru. Nejsme si ovšem jisti, zda FH jsou následkem přítomnosti všenek, FH mohou být způsobeny jiným činitelem než všenkami a to například stresem při růstu pera a nebo PDB (Vágási, 2014). Zajímavá je také hypotéza, že množství sekretů uropygiální žlázy pozitivně koreluje s abundancí všenek jak na vnitrodruhové tak mezidruhové úrovni (Galvan a Sanz, 2006; Galván a kol., 2008). Protože se všenkyně mohou živit dokonce i samotnými mikroorganismy v peří, diverzita a množství všenek může významně přispívat ke snížení právě bakteriálního zatížení peří (Soler a kol., 2012).

Hodnoty lambda v případě degradace rýdovacích per vyšly vyšší než u intenzity bakteriální zátěže v peří, ale přesto značí středníefekt fylogeneze studovaných druhů na degradabilitu i úroveň melanizace per.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo testovat, jak vybrané charakteristiky životních strategií tropických druhů ptáků ovlivňují celkové bakteriální zatížení v opeření a schopnost jejich opeření odolávat bakteriální degradaci.

Na základě analýz založených na MCMC (Markov chain Monte Carlo) modelech jsme zjistili že:

- Celkové bakteriální zatížení v opeření bylo zcela nezávislé na fylogenezi studovaných druhů a nesouviselo s žádnou z testovaných proměnných. To poukazuje na fakt, že intenzita mikrobiální zátěže v opeření vybraných tropických druhů ptáků je determinována spíše stochastickými faktory prostředí než jejich životními strategiemi.
- Rezistence opeření vůči bakteriální degradaci vykazovala střední závislost na fylogenezi studovaných druhů, kdy nejméně degradovala pera nektarivorních druhů konkrétně *Nectarinia oritis* a *Nectarinia preussi*. Domníváme se, že tento výsledek souvisel s melanizací rýdovacích per, kterou mají tyto druhy ze všech studovaných nejvyšší a také s iridescentním zbarvením, které nutí tyto druhy více investovat do údržby opeření sekrety uropygiální žlázy, které pravděpodobně pero chrání i před degradací bakteriemi.
- Degradace rýdovacích per se ukázala být závislá na úrovni jejich melanizace, kdy více melanizovaná pera odolávala bakteriální degradaci lépe než pera méně melanizovaná.
- Zároveň se ukázalo, že melanizace pera na mezidruhové i vnitrodruhové úrovni silně souvisí s poškozením pera, způsobeným tzv. „feather holes“. Menší počet „feather holes“ měla pera s vyšší úrovní melanizace, z čehož je patrné, že deponace melaninů do pera má velmi zásadní ochrannou funkci před působením ektoparazitů i mikroorganismů.

Jedinečnost výstupů této práce spočívá zejména v tom, že navzdory předpokládaným vlivům rozdílných životních strategií, existuje velmi málo komplexních a komparativních studií zabývajících se porovnáním intenzity mikrobiální zátěže v peří ptáků. Stejně tak zůstávají nepochopeny mechanismy, kterými mohou ptáci efekt mikrobiomu, nesoucího ve svém tělním pokryvu, ovlivňovat a udávat mu tak jeho funkční a evoluční význam. Navíc, pro tropické druhy ptáků podobná komparativní studie na větší škále druhů prozatím neexistuje.

7. Použitá literatura

1. Alt, G., Saag, P., Mägi, M., Kisand, V., and Mänd, R. (2015). Manipulation of parental effort affects plumage bacterial load in a wild passerine. *Oecologia*, 178(2), 451-459.
2. Bach, E., Cannavan, F. S., Duarte, F. R., Taffarel, J. A., Tsai, S. M., and Brandelli, A. (2011). Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1), 102-107.
3. Bang, C., and Schmitz, R. A. (2015). Archaea associated with human surfaces: not to be underestimated. *FEMS microbiology reviews*, fuv010.
4. Benskin, C.M.H., Wilson, K., Jones, K., and Hartley, I.R. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews* 84, 349–373.
5. Benson, R. B., Campione, N. E., Carrano, M. T., Mannion, P. D., Sullivan, C., Upchurch, P., and Evans, D. C. (2014). Rates of dinosaur body mass evolution indicate 170 million years of sustained ecological innovation on the avian stem lineage. *PLoS Biol*, 12(5), e1001853.
6. Berger, S., Disko, R. and Gwinner, H. (2003). Bacteria in starling nests. *J. Für Ornithol.*, 144, 317–322.
7. Bisson, I.- A., Marra, P. P., Burt, E. H. Jr., Sikaroodi, M. and Gillevet, P. M. (2007). A molecular comparison of plumage and soil bacteria across biogeographic, ecological, and taxonomic scales. *Microb Ecol* 54, 65–81.
8. Bisson, I.- A., Marra, P. P., Burt, E. H. Jr., Sikaroodi, M. and Gillevet, P. M. (2009). Variation in plumage microbiota depends on season and migration. *Microb Ecol* 58, 212–220.
9. Blanco, G., Tella, J. L., and Potti, J. (1997). Feather mites on group-living red-billed choughs: a non-parasitic interaction?. *Journal of Avian Biology*, 197-206.
10. Blanco, G., Tella, J. L., Potti, J., and Baz, A. (2001). Feather mites on birds: costs of parasitism or conditional outcomes?. *Journal of Avian Biology*, 32(3), 271-274.
11. Board, R.G., Loseby, S. and Miles, V.R. (1979). A note on microbial growth on hen eggshells. *Br. Poult. Sci.*, 20, 413–420.
12. Bonser, R. (1995). Melanin and the abrasion resistance of feathers. *Condor* 97, 590–591.
13. Booth, D., Clayton, D., and Block, B. (1993). Experimental demonstration of the energetic cost of parasitism in free-ranging hosts. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 253, 125–129.
14. Brown, L. H., Fry, C. H., Keith, S., Urban, E. K., and Newman, K. (1982). 2004. *The birds of Africa*.

15. Bruce, J. and Drysdale, E.M. (1994). Trans-shell transmission. In: Microbiology of the Avian Egg. (eds Board, R.G. and Fuller, R.). Chapman and Hall, London, pp. 63–91.
16. Brush, A. H. 1965. Energetics, temperature regulation and circulation in resting, active and defeathered California Quail, *Lophortyx californicus*. – Comp. Biochem. Physiol. 15: 399–421.
17. Burt, E.H., and Ichida, J.M. (1999). Occurrence of feather-degrading bacilli in the plumage of birds. AUK 116, 364–372.
18. Burt, E.H., and Ichida, J.M. (2004). Gloger's rule, feather-degrading bacteria, and color variation among song sparrows. Condor 106, 681–686.
19. Burt, E.H., Schroeder, M.R., Smith, L.A., Sroka, J.E., and McGraw, K.J. (2011). Colourful parrot feathers resist bacterial degradation. Biol. Lett. 7, 214–216.
20. Bush, S. E., Kim, D., Moyer, B. R., Lever, J., and Clayton, D. H. (2006). Is melanin a defense against feather-feeding lice?. The Auk, 123(1), 153-161.
21. Butler, M., and Johnson, A.S. (2004). Are melanized feather barbs stronger? J. Exp. Biol. 207, 285–293.
22. Carney, R. M., Vinther, J., Shawkey, M. D., d'Alba, L., and Ackermann, J. (2012). New evidence on the colour and nature of the isolated Archaeopteryx feather. Nature Communications, 3, 637.
23. Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., and Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. Science, 313(5790), 1126-1130.
24. Clark, L. and Mason, J. (1985). Use of Nest Material as Insecticidal and Anti-Pathogenic Agents by the European Starling. Oecologia, 67, 169–176.
25. Clark, L. and Mason, J.R. (1988). Effect of Biologically Active Plants Used as Nest Material and the Derived Benefit to Starling Nestlings. Oecologia, 77, 174–180.
26. Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. and Arendt, W.J. (2003). Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? Proc. R. Soc. B Biol. Sci., 270, 2233–2240.
27. Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. and Arendt, W.J. (2005). Microbial infection affects egg viability and incubation behavior in a tropical passerine. Behav. Ecol., 16, 30–36.
28. Cotgreave, P. and Clayton, D. H. (1994). Comparative analysis of time spent grooming by birds in relation to parasite load. – Behaviour 131: 171–187
29. Czirják, G. Á., Moller, A. P., Mousseau, T. A. and Heeb, P. (2010). Micro-organisms associated with feathers of barn swallows in radioactively contaminated areas around Chernobyl. – Microb. Ecol. 60: 373–380.

30. Czirjak, G.A., Pap, P.L., Vagasi, C.I., Giraudeau, M., Muresan, C., Mirleau, P., and Heeb, P. (2013). Preen gland removal increases plumage bacterial load but not that of feather-degrading bacteria. *Naturwissenschaften* 100, 145–151.
31. Dawson, A., Hinsley, S.A., Ferns, P.N., Bonser, R.H.C., and Eccleston, L. (2000). Rate of moult affects feather quality: a mechanism linking current reproductive effort to future survival. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 267, 2093–2098.
32. De La Hera, I., Pérez-Tris, J., and Tellería, J. L. (2009). Repeatable length and mass but not growth rate of individual feathers between moults in a passerine bird. *Acta Ornithologica*, 44(1), 95-99.
33. De la Hera, I., Perez-Tris, J., and Telleria, J.L. (2010). Relationships among timing of moult, moult duration and feather mass in long-distance migratory passerines. *J. Avian Biol.* 41, 609–614.
34. Dille, J. W., Christopher, M. R. and Schneegurt, M. A. (2016). Isolation and characterization of bacteria from the feathers of wild Dark-eyed Juncos (*Junco hyemalis*). – *Auk* 133: 155–167.
35. Eckburg, P. B., Lepp, P. W., and Relman, D. A. (2003). Archaea and their potential role in human disease. *Infection and immunity*, 71(2), 591-596.
36. Evans, J. K., Buchanan, K. L., Griffith, S. C., Klasing, K. C., and Addison, B. (2017). Ecoimmunology and microbial ecology: Contributions to avian behavior, physiology, and life history. *Hormones and Behavior*.
37. Field DJ, D’Alba L, Vinther J, Webb SM, Gearty W, Shawkey MD (2013) Melanin Concentration Gradients in Modern and Fossil Feathers. *PLoS ONE* 8(3): e59451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059451>
38. Fülöp, A., Czirják, G. Á., Pap, P. L. and Vágási, C. I. (2016). Feather-degrading bacteria, uropygial gland and feather quality in House Sparrows *Passer domesticus*. – *Ibis* 158: 362–370.
39. Fülöp, A., Vágási, C. I., and Pap, P. L. (2017). Cohabitation with farm animals rather than breeding effort increases the infection with feather-associated bacteria in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Journal of Avian Biology*.
40. Galvan, I. and Sanz, J.J. (2006). Feather mite abundance increases with uropygial gland size and plumage yellowness in Great Tits *Parus major*. *Ibis* 148: 687–697.
41. Galván, I., Barba, E., Piculo, R., Cantó, J. L., Cortés, V., Monrós, J. S., and Proctor, H. (2008). Feather mites and birds: an interaction mediated by uropygial gland size?. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 133-144.
42. Garamszegi, L. Z. (2014). Modern phylogenetic comparative methods and their application in evolutionary biology. *Concepts and Practice*. London, UK: Springer.
43. Giraudeau, M., Duval, C., Guillon, N., Bretagnolle, V., Gutierrez, C., and Heeb, P. (2010). Effects of access to preen gland secretions on mallard plumage. *Naturwissenschaften* 97, 577–581.

44. Giraudeau, M., Czirjak, G.A., Duval, C., Bretagnolle, V., Gutierrez, C., Guillon, N., and Heeb, P. (2013). Effect of preen oil on plumage bacteria: An experimental test with the mallard. *Behav. Processes* 92, 1–5.
45. Godard, R.D., Morgan Wilson, C., Frick, J.W., Siegel, P.B. and Bowers, B.B. (2007). The effects of exposure and microbes on hatchability of eggs in open-cup and cavity nests. *J. Avian Biol.*, 38, 709–716.
46. Goldstein, G., Flory, K.R., Browne, B.A., Majid, S., Ichida, J.M., and Burt, E.H. (2004). Bacterial degradation of black and white feathers. *AUK* 121, 656–659.
47. Goodenough, A.E., and Stallwood, B. (2010). Intraspecific Variation and Interspecific Differences in the Bacterial and Fungal Assemblages of Blue Tit (*Cyanistes caeruleus*) and Great Tit (*Parus major*) Nests. *Microb. Ecol.*, 59, 221–232.
48. Grande, J.M., Negro, J.J., and Torres, M.J. (2004). The evolution of bird plumage colouration: a role for feather-degrading bacteria? *Ardeola Rev. Iber. Ornitol.*, 51, 375–383.
49. Griffith, S.C., Parker, T.H., and Olson, V.A. (2006). Melanin-versus carotenoid-based sexual signals: is the difference really so black and red? *Anim. Behav.* 71, 749–763.
50. Grizard, S., Dini-Andreote, F., Tieleman, B. I., and Salles, J. F. (2014). Dynamics of bacterial and fungal communities associated with eggshells during incubation. *Ecology and evolution*, 4(7), 1140-1157.
51. Gunderson, A. R. (2008). Feather-degrading bacteria: a new frontier in avian and host–parasite research? – *Auk* 125: 972–979. bacha je A a B
52. Gunderson, A.R., Frame, A.M., Swaddle, J.P., and Forsyth, M.H. (2008). Resistance of melanized feathers to bacterial degradation: is it really so black and white? *Journal of Avian Biology* 39, 539–545.
53. Gunderson, A.R., Forsyth, M.H., and Swaddle, J.P. (2009). Evidence that plumage bacteria influence feather coloration and body condition of eastern bluebirds *Sialia sialis*. *Journal of Avian Biology* 40, 440–447.
54. Hails, C.J., and Bryant, D.M. (1979). Reproductive energetics of a free-living bird. *Journal of Animal Ecology* 48, 471–482.
55. Hall, K.S.S., and Fransson, T. (2000). Lesser Whitethroats under time-constraint moult more rapidly and grow shorter wing feathers. *J. Avian Biol.* 31, 583–587.
56. Hansell, M.H. (2000). *Bird nests and construction behaviour*. Cambridge University Press.
57. Hubálek, Z. (2004). An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. – *J. Wildl. Dis.* 40: 639–659.
58. Ichida, J. M., Krizova, L., LeFevre, C. A., Keener, H. M., Elwell, D. L. and Burt, E. H. Jr. (2001). Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. – *J. Microbiol. Meth.* 47: 199–208.

59. Jacob, J., and Ziswiler, V. (1982). The uropygial gland. *Avian biology*, 6, 199-324.
60. Jacob, J., Eigener, U., and Hoppe, U. (1997). The structure of preen gland waxes from pelecaniform birds containing 3,7-dimethyloctan-1-ol - An active ingredient against dermatophytes. *Z.Naturforsch.(C)* 52, 114–123.
61. Jacob, S., Colmas, L., Parthuisot, N. and Heeb, P. (2014). Do feather-degrading bacteria actually degrade feather colour? No significant effects of plumage microbiome modifications on feather colouration in wild great tits. – *Naturwissenschaften* 101: 929–938.
62. Jawor, J. M., and Breitwisch, R. (2003). Melanin ornaments, honesty, and sexual selection. *The Auk*, 120(2), 249-265.
63. Johnson, E.I., Stouffer, P.C., and Bierregaard, R.O. (2012). The phenology of molting, breeding and their overlap in central Amazonian birds. *J. Avian Biol.* 43, 141–154.
64. Jovani, R., and Blanco, G. (2000). Resemblance within flocks and individual differences in feather mite abundance on long-tailed tits, *Aegithalos caudatus* (L.). *Ecoscience*, 7(4), 428-432.
65. Kent, C. M. and Burt, E. H. Jr. (2016). Feather-degrading bacilli in the plumage of wild birds: Prevalence and relation to feather wear. – *Auk* 133: 583–592.
66. Kilgas, P., Saag, P., Mägi, M., Tilgar, V., and Mänd, R. (2012). Plumage bacterial load increases during nest-building in a passerine bird. *Journal of Ornithology*, 153(3), 833-838.
67. Kose, M., Mänd, R., and Møller, A. P. (1999). Sexual selection for white tail spots in the barn swallow in relation to habitat choice by feather lice. *Animal Behaviour*, 58(6), 1201-1205.
68. Kreisinger, J., Čížková, D., Kropáčková, L., and Albrecht, T. (2015). Cloacal microbiome structure in a long-distance migratory bird assessed using deep 16sRNA pyrosequencing. *PloS one*, 10(9), e0137401.
69. Kreisinger, J., Kropáčková, L., Petrželková, A., Adámková, M., Tomášek, O., Martin, J. F. and Albrecht, T. (2017). Temporal stability and the effect of transgenerational transfer on fecal microbiota structure in a long distance migratory bird. *Frontiers in Microbiology*, 8.
70. Kurzak, P., Ehrmann, M. A., and Vogel, R. F. (1998). Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Systematic and applied microbiology*, 21(4), 588-592.
71. LaMontagne, M. G., Michel, F. C., Holden, P. A. and Reddy, C. A. (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 49(3), 255-264.

72. Leclaire, S., Merklings, T., Raynaud, C., Giacinti, G., Bessiere, J.-M., Hatch, S.A., and Danchin, E. (2011). An individual and a sex odor signature in kittiwakes? Study of the semiochemical composition of preen secretion and preen down feathers. *Naturwissenschaften* 98, 615–624.
73. Leclaire, S., Pierret, P., Chatelain, M. and Gasparini, J. (2014). Feather bacterial load affects plumage condition, iridescent color, and investment in preening in pigeons. – *Behav. Ecol.* 25: 1192– 1198.
74. Leclaire, S., Czirják, G. Á., Hammouda, A. and Gasparini, J. 2015. Feather bacterial load shapes the trade-off between preening and immunity in pigeons. – *BMC Evol. Biol.* 15: 60.
75. Lin, X., Kelemen, D. W., Miller, E. S., and Shih, J. C. (1995). Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1469-1474.
76. Liu, H., Kohler, J., and Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science*, 266(5191), 1723.
77. López-Gutiérrez, J. C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G., and Philippot, L. (2004). Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 57(3), 399-407.
78. Lopez-Rull, I., Pagan, I., and Macias Garcia, C. (2010). Cosmetic enhancement of signal coloration: experimental evidence in the house finch. *Behav. Ecol.* 21, 781–787.
79. Lu, J., Santo Domingo, J. W., Lamendella, R., Edge, T., and Hill, S. (2008). Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Applied and environmental microbiology*, 74(13), 3969-3976.
80. Lucas, F.S., Broennimann, O., Febbraro, I., and Heeb, P. (2003). High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microb. Ecol.* 45, 282–290.
81. Lucas, F.S., Moureau, B., Jourdie, V., and Heeb, P. (2005). Brood size modifications affect plumage bacterial assemblages of European starlings. *Mol. Ecol.* 14, 639–646.
82. Marks, M. S., and Seabra, M. C. (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(10), 738-748.
83. Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruiz-Rodriguez, M., Soler, J.J., Martin-Vivaldi, M., Maqueda, M., and Martinez-Bueno, M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4245–4249.

84. Martín-Vivaldi, M., Ruiz-Rodríguez, M., Jose Soler, J., Manuel Peralta-Sánchez, J., Mendez, M., Valdivia, E., Manuel Martín-Platero, A., and Martínez-Bueno, M. (2009). Seasonal, sexual and developmental differences in hoopoe *Upupa epops* preen gland morphology and secretions: evidence for a role of bacteria. *J. Avian Biol.* 40, 191–205.
85. Martín-Vivaldi, M., Peña, A., Peralta-Sánchez, J. M., Sánchez, L., Ananou, S., Ruiz-Rodríguez, M. and Soler, J. J. (2010). Antimicrobial chemicals in hoopoe preen secretions are produced by symbiotic bacteria. – *Proc. R. Soc. B* 277: 123–130.
86. Martínez-García, Á., Soler, J. J., Rodríguez-Ruano, S. M., Martínez-Bueno, M., Martín-Platero, A. M., Juárez-García, N. and Martín-Vivaldi, M. (2015). Preening as a vehicle for key bacteria in hoopoes. – *Microb. Ecol.* 70: 1024–1033.
87. Mennerat, A., Mirleau, P., Blondel, J., Perret, P., Lambrechts, M.M. and Heeb, P. (2009). Aromatic plants in nests of the blue tit *Cyanistes caeruleus* protect chicks from bacteria. *Oecologia*, 161, 849–855.
88. Moller, A. P. (1991). The preening activity of swallows, *Hirundo rustica*, in relation to experimentally manipulated loads of haematophagous mites. – *Anim. Behav.* 42: 251–260.
89. Moller, A.P., Czirjak, G.A., and Heeb, P. (2009). Feather micro-organisms and uropygial antimicrobial defences in a colonial passerine bird. *Funct. Ecol.* 23, 1097–1102.
90. Moller, A.P., Erritzoe, J., and Tottrup Nielsen, J. (2010). Predators and microorganisms of prey: goshawks prefer prey with small uropygial glands. *Functional Ecology* 24, 608–613.
91. Moller, A.P., Peralta-Sánchez, J.M., Nielsen, J.T., Lopez-Hernandez, E., and Soler, J.J. (2012). Goshawk prey have more bacteria than non-prey. *J. Anim. Ecol.* 81, 403–410.
92. Moreno-Rueda, G. (2010). Uropygial gland size correlates with feather holes, body condition and wingbar size in the house sparrow *Passer domesticus*. *J. Avian Biol.* 41, 229–236.
93. Moreno-Rueda, G. (2011). House Sparrows *Passer domesticus* with larger uropygial glands show reduced feather wear. *Ibis* 153, 195–198.
94. Moyer, A. E., Zheng, W., Johnson, E. A., Lamanna, M. C., Li, D. Q., Lacovara, K. J., and Schweitzer, M. H. (2014). Melanosomes or microbes: testing an alternative hypothesis for the origin of microbodies in fossil feathers. *Scientific reports*, 4, 4233.
95. Murphy, M. E., Miller, B. T., and King, J. R. (1989). A structural comparison of fault bars with feather defects known to be nutritionally induced. *Canadian Journal of Zoology*, 67(5), 1311–1317.

96. Muyzer, G., De Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
97. Muyzer, G., and de Waal, E. C. (1994). Determination of the genetic diversity of microbial communities using DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA. In *Microbial Mats* (pp. 207-214). Springer Berlin Heidelberg.
98. Muza, M.M., Burt, E.H., and Ichida, J.M. (2000). Distribution of bacteria on feathers of some eastern North American birds. *Wilson Bull.* 112, 432–435.
99. Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., and Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257-266.
100. Ōmura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., and Kikuchi, H. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12215-12220.
101. Pap, P. L., Barta, Z., Tökölyi, J., and Vágási, I. C. (2007). Increase of feather quality during moult: a possible implication of feather deformities in the evolution of partial moult in the great tit *Parus major*. *Journal of Avian Biology*, 38(4), 471-478.
102. Pap, P.L., Czirjak, G.A., Vagasi, C.I., Barta, Z., and Hasselquist, D. (2010). Sexual dimorphism in immune function changes during the annual cycle in house sparrows. *Naturwissenschaften* 97, 891–901.
103. Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., and Lan, C. Q. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of applied microbiology*, 104(1), 1-13.
104. Partridge, L., and Harvey, P. (1985). *Evolutionary Biology - Costs of Reproduction*. *Nature* 316, 20–20.
105. Peele, A.M., Burt, E.H., Schroeder, M.R., and Greenberg, R.S. (2009). Dark Color of the Coastal Plain Swamp Sparrow (*melospiza Georgiana Nigrescens*) May Be an Evolutionary Response to Occurrence and Abundance. *AUK* 126, 531–535.
106. Peralta-Sánchez, J.M., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A.M., Martínez-Bueno, M., Oñate, M., Ruiz-Rodríguez, M., et al. (2012). Avian life history traits influence eggshell bacterial loads: a comparative analysis. *Ibis*, 154, 725–737.
107. Peralta-Sanchez, J. M., Møller, A. P., Martín-Platero, A. M. and Soler, J. J. (2010). Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: an experimental study. – *Funct. Ecol.* 24: 426–433.

108. Peralta-Sanchez, J. M., Soler, J. J., Martín-Platero, A. M., Knight, R., Martínez-Bueno, M. and Møller, A. P. (2014). Eggshell bacterial load is related to antimicrobial properties of feathers lining barn swallow nests. – *Microb. Ecol.* 67: 480–487.
109. Price, D. L., Hough-Golistein, J., and Smith, M. T. (2003). Biology, rearing, and preliminary evaluation of host range of two potential biological control agents for mile-a-minute weed, *Polygonum perfoliatum* L. *Environ. Entomol.* 32, 229–236.
110. Prum, R. O. (2006). Anatomy, physics, and evolution of structural colors. *Bird coloration*, 1, 295-353.
111. Ramnani, P., Singh, R., and Gupta, R. (2005). Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Can. J. Microbiol.* 51, 191–196.
112. Reneerkens, J., Versteegh, M.A., Schneider, A.M., Piersma, T., and Burt, E.H. (2008). Seasonally changing preen-wax composition: Red Knots' (*Calidris canutus*) flexible defense against feather-degrading bacteria? *AUK* 125, 285–290.
113. Roulin, A. (2007). Melanin pigmentation negatively correlates with plumage preening effort in barn owls. *Funct. Ecol.* 21, 264–271.
114. Ruiz-Rodríguez, M., Valdivia, E., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A. M., Martínez-Bueno, M., Méndez, M., and Soler, J. J. (2012). Antimicrobial activity and genetic profile of enterococci isolated from hoopoes uropygial gland. *PloS one*, 7(7), e41843.
115. Ruiz-de-Castañeda, R., Burt, E. H., González-Braojos, S., and Moreno, J. (2012). Bacterial degradability of an intrafeather unmelanized ornament: a role for feather-degrading bacteria in sexual selection? *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(2), 409-419.
116. Ruiz-de-Castañeda, R., Vela, A.I., Lobato, E., Briones, V. and Moreno, J. (2011). Bacterial loads on eggshells of the Pied Flycatcher: environmental and maternal factors. *The Condor*, 113, 200–208.
117. Ruiz-González, M. X., Czirájk, G. Á., Genevoux, P., Møller, A. P., Mousseau, T. A. and Heeb, P. (2016). Resistance of feather-associated bacteria to intermediate levels of ionizing radiation near Chernobyl. – *Sci. Rep.* 6: 22969.
118. Ruiz-Rodríguez, M., Martínez-Bueno, M., Martín-Vivaldi, M., Valdivia, E., and Soler, J. J. (2013). Bacteriocins with a broader antimicrobial spectrum prevail in enterococcal symbionts isolated from the hoopoe's uropygial gland. *FEMS microbiology ecology*, 85(3), 495-502.
119. Ruiz-Rodríguez, M., Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A. M., Méndez, M., Peralta-Sánchez, J. M., and Martínez-Bueno, M. (2014). Environmental factors shape the community of symbionts in the hoopoe uropygial gland more than genetic factors. *Applied and environmental microbiology*, 80(21), 6714-6723.

120. Ruiz-Rodríguez, M., Tomas, G., Martín-Gálvez, D., Ruiz-Castellano, C., and Soler, J. J. (2015). Bacteria and the evolution of honest signals. The case of ornamental throat feathers in spotless starlings. *Functional Ecology*, 29(5), 701–709.
121. Ruiz-Rodríguez, M., Valdivia, E., Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A.M., and Martínez-Bueno, M. (2009). Symbiotic bacteria living in the hoopoe's uropygial gland prevent feather degradation. *J Exp Biol* 212, 3621–3626.
122. Saag, P., Tilgar, V., Maend, R., Kilgas, P., and Maegi, M. (2011a). Plumage bacterial assemblages in a breeding wild passerine: relationships with ecological factors and body condition. *Microb. Ecol.* 61, 740–749. co je a co je b?
123. Saag, P., Maend, R., Tilgar, V., Kilgas, P., Maegi, M., and Rasmann, E. (2011b). Plumage bacterial load is related to species, sex, biometrics and fledging success in co-occurring cavity-breeding passerines. *Acta Ornithol.* 46, 191–201.
124. Saino, N., Romano, M., Caprioli, M., Ambrosini, R., Rubolini, D., Scandolara, C., and Romano, A. (2012). A ptilochronological study of carry-over effects of conditions during wintering on breeding performance in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Journal of Avian Biology*, 43(6), 513–524.
125. Sarasola, J. H. and Jovani, R. (2006). Risk of feather damage explains fault bar occurrence in a migrant hawk, the Swainson's hawk *Buteo swainsoni*. *Journal of Avian Biology* 37, 29–35.
126. Sengupta and Sengupta, S. (1981). Adaptive significance of the use of margosa leaves in nests of House sparrows *Passer domesticus*. *EMU*, 81, 114–115.
127. Serra, L., Griggio, M., Licheri, D., and Pilastro, A. (2007). Molt speed constrains the expression of a carotenoid-based sexual ornament. *J. Evol. Biol.* 20, 2028–2034.
128. Shawkey, M.D., and Hill, G.E. (2006). Significance of a basal melanin layer to production of non-iridescent structural plumage color: evidence from an amelanotic Steller's jay (*Cyanocitta stelleri*). *J. Exp. Biol.* 209, 1245–1250.
129. Shawkey, M.D., Pillai, S.R., and Hill, G.E. (2003). Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. *J. Avian Biol.* 34, 345–349.
130. Shawkey, M.D., Mills, K.L., Dale, C., and Hill, G.E. (2005). Microbial diversity of wild bird feathers revealed through culture-based and culture-independent techniques. *Microb. Ecol.* 50, 40–47.
131. Shawkey, M.D., Pillai, S.R., Hill, G.E., Siefferman, L.M., and Roberts, S.R. (2007). Bacteria as an agent for change in structural plumage color: correlational and experimental evidence. *The American Naturalist* 169, S112–S121.
132. Shawkey, M.D., Pillai, S.R., and Hill, G.E. (2009). Do feather-degrading bacteria affect sexually selected plumage color? *Naturwissenschaften* 96, 123–128.

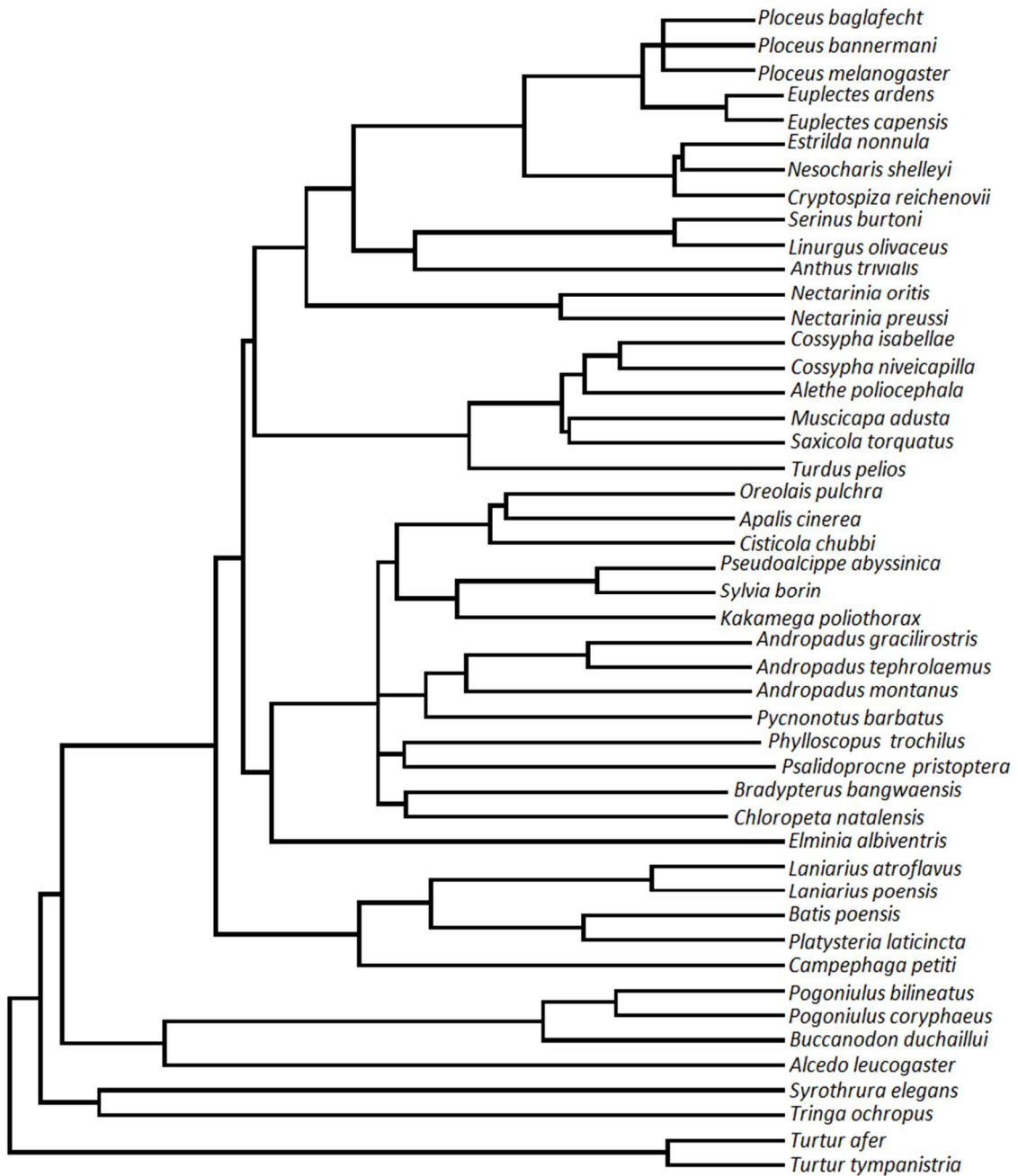
133. Soini, H.A., Schrock, S.E., Bruce, K.E., Wiesler, D., Ketterson, E.D., and Novotny, M.V. (2007). Seasonal variation in volatile compound profiles of preen gland secretions of the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *J. Chem. Ecol.* 33, 183–198.
134. Soler, J.J., Martin-Vivaldi, M., Ruiz-Rodriguez, M., Valdivia, E., Martin-Platero, A.M., Martinez-Bueno, M., Peralta-Sanchez, J.M., and Mendez, M. (2008). Symbiotic association between hoopoes and antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland. *Funct. Ecol.* 22, 864–871.
135. Soler, J.J., Peralta-Sánchez, J.M., Flensted-Jensen, E., Martín-Platero, A.M. and Møller, A.P. (2011). Innate humoral immunity is related to eggshell bacterial load of European birds: a comparative analysis. *Naturwissenschaften*, 98, 807–813.
136. Soler, J. J., Peralta-Sánchez, J. M., Martín-Platero, A. M., Martín-Vivaldi, M., Martínez-Bueno, M., and Moller, A. P. (2012). The evolution of size of the uropygial gland: mutualistic feather mites and uropygial secretion reduce bacterial loads of eggshells and hatching failures of European birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(9), 1779-1791.
137. Sorci, G. (2013). Immunity, resistance and tolerance in bird–parasite interactions. *Parasite immunology*, 35(11), 350-361.
138. Stolp, H. (1988). *Microbial ecology: organisms, habitats, activities.* – Cambridge Univ. Press.
139. Stropfova, V., Laukova, A., and Mudronova, D. (2003). Effect of bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* EF55 on the composition of avian gastrointestinal microflora. *Acta Vet. BRNO* 72, 559–564.
140. Su, H., McKelvey, J., Rollins, D., Zhang, M., Brightsmith, D. J., Derr, J., and Zhang, S. (2014). Cultivable bacterial microbiota of northern bobwhite (*Colinus virginianus*): a new reservoir of antimicrobial resistance?. *PloS one*, 9(6), e99826.
141. Swaddle, J.P., and Witter, M.S. (1997). The effects of molt on the flight performance, body mass, and behavior of European starlings (*Sturnus vulgaris*): An experimental approach. *Can. J. Zool.-Rev. Can. Zool.* 75, 1135–1146.
142. Theron, H., Venter, P. and Lues, J.F. (2003). Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. *Food Res. Int.*, 36, 969–975.
143. Vágási, C. I. (2014). The origin of feather holes: a word of caution. *Journal of Avian Biology*, 45(5), 431-436.
144. Vágási, C. I., Pap, P. L., Tökölyi, J., Székely, E., and Barta, Z. (2011). Correlates of variation in flight feather quality in the great tit *Parus major*. *Ardea*, 99(1), 53-60.
145. Vas, Z., Csörgő, T., Møller, A. P., and Rózsa, L. (2008). The feather holes on the barn swallow *Hirundo rustica* and other small passerines are probably caused by *Brueelia* spp. lice. *Journal of Parasitology*, 94(6), 1438-1440.

146. Ventura, M., O'flaherty, S., Claesson, M. J., Turrone, F., Klaenhammer, T. R., Van Sinderen, D., and O'toole, P. W. (2009). Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 61-71.
147. Vereá, C., Vitelli-Flores, J., Dorta, B., Isturiz, T., Solorzano, A., Rodríguez-Lemoine, C. and Bosque, C. 2014. Feather-degrading bacteria from the plumage of Neotropical Spectacled Thrushes (*Turdus nudigenis*). – *Auk* 131: 100–109.
148. Větrovský, T. and Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS ONE*, 8 (2), art. no. e57923.
149. Viblanc, V. A., Mathien, A., Saraux, C., Viera, V. M. and Groscolas, R. (2011). It costs to be clean and fit: energetics of comfort behavior in breeding-fasting penguins. – *PLoS ONE* 6: e21110.
150. Waite, D. W., and Taylor, M. W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in microbiology*, 5, 223.
151. Walls, J.G., Hepp, G.R. and Eckhardt, L.G. (2012). Effects of nest reuse and onse
152. Walsberg, G. (1983). Coat color and solar heat gain in animals. *Bioscience* 33, 88–91.
153. Wang, J.M., Firestone, M.K. and Beissinger, S.R. (2011). Microbial and environmental effects on avian egg viability: Do tropical mechanisms act in a temperate environment? *Ecology*, 92, 1137–1145.
154. Weber, T. P., Borgudd, J., Hedenström, A., Persson, K., and Sandberg, G. (2005). Resistance of flight feathers to mechanical fatigue covaries with moult strategy in two warbler species. *Biology letters*, 1(1), 27-30.
155. Whitaker, J. M., Cristol, D. A. and Forsyth, M. H. (2005). Prevalence and genetic diversity of *Bacillus licheniformis* in avian plumage. – *J. Field Ornithol.* 76: 264–270.
156. Whittaker, D.J., Richmond, K.M., Miller, A.K., Kiley, R., Burns, C.B., Atwell, J.W., and Ketterson, E.D. (2011). Intraspecific preen oil odor preferences in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *Behav. Ecol.* 22, 1256–1263.
157. Wiebe, K. L., Koenig, W. D. and Martin, K. (2007). Costs and benefits of nest reuse versus excavation in cavity-nesting birds. *Annales Zoologici Fennici*, 44, 209–217.
158. Wrede, C., Dreier, A., Kokoschka, S., and Hoppert, M. (2012). Archaea in symbioses. *Archaea*, 2012.
159. Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS microbiology reviews*, 32(5), 723-735.

160. Zink, R. M., and J. V. Remsen, Jr. (1986). Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. Pages 1–69 in *Current Ornithology*, vol. 4 (R. F. Johnston, Ed.). Plenum Press, New York.

8. Přílohy

Fylogenetický strom všech zkoumaných druhů



Tabulka 11. Průměrná hodnota celkového bakteriálního zatížení pro jednotlivé druhy, u kterých byla hodnota zatížení zjištěna minimálně u dvou jedinců

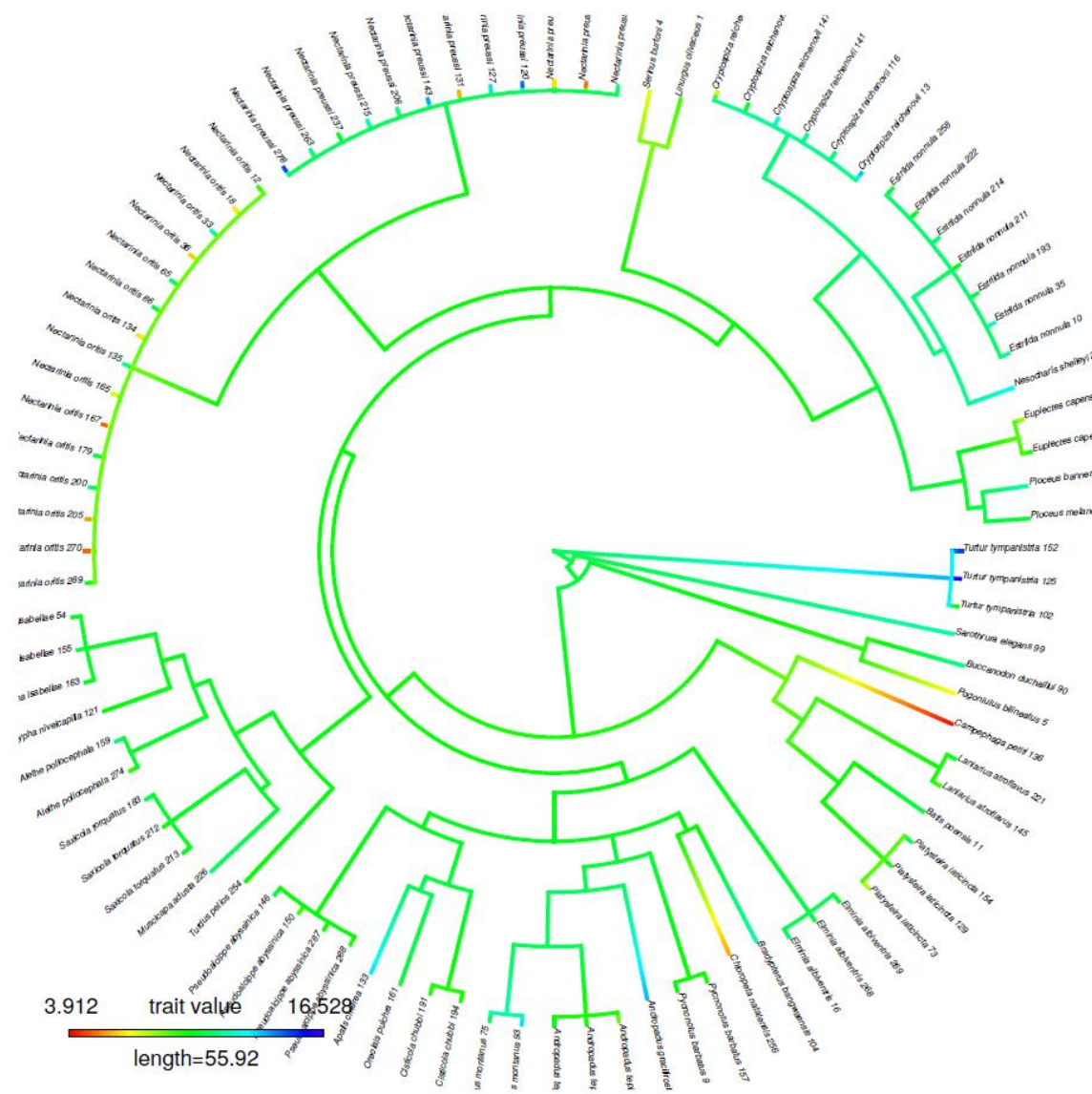
Název druhu	Průměrná hodnota bakteriálního zatížení
<i>Turtur tympanistria</i>	6362767
<i>Andropadus montanus</i>	388548
<i>Cryptospiza reichenovii</i>	312239
<i>Nectarinia oritis</i>	69561
<i>Estrilda nonnula</i>	66886
<i>Alethe poliocephala</i>	56752
<i>Elminia albiventris</i>	52351
<i>Cossypha isabellae</i>	37062
<i>Saxicola torquatus</i>	32858
<i>Laniarius atroflavus</i>	24986
<i>Pseudoalcippe abyssinica</i>	23736
<i>Andropadus tephrolaemus</i>	19889
<i>Pycnonotus barbatus</i>	18089
<i>Cisticola chubbi</i>	14710
<i>Euplectes capensis</i>	9314

Tabulka 12. Průměrná hodnota degradability per pro jednotlivé druhy, u kterých byla hodnota degradability zjištěna minimálně u dvou jedinců

Název druhu	Průměrná hodnota degradability
<i>Cossypha isabellae</i>	27187
<i>Cossypha niveicapilla</i>	13836
<i>Pseudoalcippe abyssinica</i>	11030
<i>Ploceus melanogaster</i>	8101
<i>Kakamega poliothorax</i>	7576
<i>Oreolais pulchra</i>	7091
<i>Ploceus bannermani</i>	6354
<i>Platysteira laticincta</i>	4994
<i>Laniarius atroflavus</i>	4967
<i>Andropadus gracilirostris</i>	4455
<i>Bradypterus bangwaensis</i>	4398
<i>Linurgus olivaceus</i>	4201
<i>Elminia albiventris</i>	4142
<i>Turtur tympanistria</i>	4070
<i>Apalis cinerea</i>	4035
<i>Andropadus montanus</i>	4001
<i>Euplectes capensis</i>	3909
<i>Sylvia borin</i>	3846
<i>Alethe poliocephala</i>	3232
<i>Andropadus tephrolaemus</i>	3184
<i>Nectarinia oritis</i>	3074
<i>Chloropeta natalensis</i>	3036
<i>Cryptospiza reichenovii</i>	2992
<i>Muscicapa adusta</i>	2633
<i>Buccanodon duchaillui</i>	2315
<i>Euplectes ardens</i>	2197
<i>Cisticola chubbi</i>	2177
<i>Saxicola torquatus</i>	1976
<i>Pycnonotus barbatus</i>	1733
<i>Phylloscopus trochilus</i>	1307
<i>Estrilda nonnula</i>	1268
<i>Nectarinia preussi</i>	938

„Countmap“ grafické znázornění intenzit bakteriálního zatížení v opeření pro jednotlivé jedince cílových druhů

Poznámka: Intenzity jsou barevně odlišeny; červená-žlutá=nízká intenzita; zelená=střední intenzita; modrá-fialová=vysoké intenzity bakteriální zátěže



Obrázek: Znázornění vybraných rýdovacích per testovaných druhů ptáků

