ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Ing. Martina Geigerová

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Synbiotika pro mláďata přežvýkavců

Synbiotics for young ruminants

autoreferát doktorské disertační práce

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Obecná zootechnika

Školitel: **prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.**
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Konzultant **Ing. Věra Bunešová. Ph.D.**
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Oponenti: Prof., MVDr. Vladimír Kmeť, DrSc. (ÚFHZ SAV, Košice)
Ing. Jan Kopečný, DrSc. (ÚŽFG AV ČR, v. v. i., Praha)
MVDr. Gabriela Krausová, Ph.D. (Milcom a.s., Praha)

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne: 26. 9. 2017 v 10:30 hod. na: Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze. S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU v Praze.

P r a h a 2 0 1 7

Summary

The ban of antibiotics as growth promoters has been a challenge for livestock nutrition, increasing the need to find other methods to prevent pathogenic bacterial colonization and promote animal health. One of the many options is the use of probiotics and prebiotics, which can modulate gut microbiota towards host-protecting functions to support livestock health. The major assumption of probiotic effect is its ability to survive in the gut.

The main aim of this dissertation was to find suitable combination of probiotics and prebiotics for young ruminants. Bifidobacteria can be considered as appropriate strains of bacteria for calves. Ten strains of calf-origin bifidobacteria with probiotic properties were selected for 3 *in vivo* testing. In the first experiment, the effect of rearing systems and diets composition on the survival of administered bifidobacteria in the digestive tract of calves was evaluated. As a result, the duration of temporary bifidobacteria colonization in the intestine was strongly affected by the farming system including diet composition and was significantly better in extensive system with milk feeding compare to intensive system with combined diet. In the second experiment, the fermented milk and freeze-dried form as a two different modes of administration of bifidobacteria to calves were compared. The result shows that both forms of applications are suitable. The third experiment was focused on assembling a suitable combination of probiotics and commercial prebiotics for calves. Based on results of substrate preferences, prebiotics were chosen. Newly designed combination of bifidobacteria and commercial prebiotic seems to be a promising synbiotic. Prebiotics promote probiotics' survival, which is an important prerequisite for the functionality of synbiotic product.

For the second part of this dissertation, an evaluation of prebiotic effect of soya and lupin on broiler chickens and ducks' microbiota was performed. Both plants contain oligosaccharides that can be a non negligible part of the animal feed. According to our results, lupin meal contains higher amounts of oligosaccharides than soya meal. A higher amount of oligosaccharides in feed with lupine meal positively influenced the bacterial composition of broiler chickens and ducks' gut but negatively affected their live weight.

Obsah

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE 4

2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE 6

2.1 Hypotéza 6

2.2 Cíle práce 6

3 MATERIÁL A METODY 7

3.1 Testované kmeny bifidobakterií 7

3.2 Experimentální podávání probiotik a prebiotik 7

3.3 Vliv způsobu odchovu telat a rozdílné diety na přežívání podaných bifidobakterií v trávicím traktu telat 8

3.4 Přežívání bifidobakterií v trávicím traktu telat po podání v lyofilizované formě nebo ve formě fermentovaného mléka 8

3.5 Vliv prebiotik na přežívání bifidobakterií v trávicím traktu 9

3.6 Vliv lupiny bílé v krmné dávce brojlerových kuřat a kachen na složení střevní mikrobioty 9

4 VÝSLEDKY A DISKUZE 10

5 ZÁVĚRY 15

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 16

7 SEZNAM PUBLIKACÍ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE 20

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

Gastrointestinální trakt hospodářských zvířat je osídlen rozmanitou mikrobiotou, která je tvořena převážně bakteriemi. Odhaduje se, že savčí mikrobiota trávicího traktu je složena z 500 až 1000 bakteriálních druhů (Leser and Mølbak, 2009). Vyvážená střevní mikrobiota, která má nutriční, imunologickou a fyziologickou funkci, hraje důležitou roli ve zdraví jedince. Naopak nerovnováha ve složení střevní mikrobioty může vést k různým poruchám trávení a zvyšuje se tak riziko mikrobiálních infekcí, které jsou hlavní příčinou ekonomických ztrát v důsledku mortality v intenzivních chovech hospodářských zvířat (Mellado et al., 2014). Dříve se jako prevence infekčních onemocnění a pro úpravu složení střevní mikrobioty gastrointestinálního traktu používala antibiotika, ale jejich používání jako krmných aditiv bylo v roce 2006 v Evropské unii zakázáno. Navíc bývá v podmínkách velkochovu nepřirozený vývoj intestinální mikrobioty mláďat přežvýkavců a díky němu častější výskyt průjmových onemocnění. Tyto okolnosti zvýšily zájem o využití probiotik a prebiotik ve výživě hospodářských zvířat, která by tak preventivně působila proti střevním infekcím a podporovala zdraví mláďat.

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos (FAO/WHO, 2013), zatímco prebiotika jsou nestravitelné látky, které jsou selektivně metabolizovány střevními bakteriemi a tím prospívají zdraví hostitele (Gibson et al., 2004). Aby látka mohla být klasifikována jako prebiotikum, nesmí být hydrolyzována nebo absorbována v žaludku ani v tenkém střevě a musí být selektivně metabolizována v tlustém střevě prospěšnými symbiotickými bakteriemi, jako jsou například bifidobakterie a laktobacily (Manning et al., 2004). Synbiotika představují definovanou směs probiotik a prebiotik, kde prebiotická část by měla selektivně podporovat použité probiotikum. Díky kombinaci obou složek se zlepšuje přežívání a kolonizace dodaných probiotických bakterií (De Preter et al., 2011).

V současné době jsou k dispozici studie zabývající se podáváním probiotik a/nebo prebiotik telatům, nicméně je jich málo a většina z nich je zaměřená pouze na podávání probiotik (Frizzo et al., 2011; Morrison et al., 2010; Roodposhti and Dabiri, 2012). Problémem také je, že tyto studie jsou primárně zaměřené na růstové parametry, jako jsou váhové přírůstky zvířat, konverze krmiva nebo příjem krmiva, ale už není sledováno, zda jsou vybrané kmeny schopny přežívat v trávicím traktu. V experimentech jsou sice použité bakterie, které mají probiotický potenciál stanovený v laboratorních testech, ale k probiotickému efektu nedojde, pokud bakterie nejsou schopny alespoň po nějakou dobu kolonizovat trávicí trakt. To může být i jedním z důvodů, proč některé studie popisují, že podávání probiotik nemělo žádný vliv na růstové parametry telat oproti kontrole (Frizzo et al., 2011).

Jako vhodný probiotický bakteriální rod pro telata mohou být považovány bifidobakterie (Rada et al., 2006). Bifidobakterie jsou běžně používány jako probiotika pro lidskou výživu v různých potravinových produktech a z dlouhodobé historie jejich používání jsou považovány za obecně bezpečné (GRAS – Generally recognized as safe). Zájem o jejich využití ve výživě hospodářských zvířat je zatím spíše okrajový, i když jsou bifidobakterie běžnou součástí zdravé střevní mikrobioty mnoho druhů zvířat. Z vědecké literatury je známo, že bifidobakterie jsou dominantní skupinou bakterií v trávicím traktu kojených novorozenců (Voreades et al., 2014). Podobně je tomu i u telat, kde bifidobakterie patří mezi dominantní skupinu bakterií a podle Rada et al. (2006) jejich počty v GIT převyšují počty laktobacilů až o dva řády. Z tohoto důvodu jsou bifidobakterie vhodnější probiotika pro telata než laktobacily, i když laktobacily také patří mezi probiotické mikroorganismy a jsou jako probiotika pro zvířata používány častěji. Studií zabývající se podáváním bifidobakterií mláďatům přežvýkavců je málo a to i přesto, že u nich lze očekávat stejný pozitivní efekt na zdravotní stav hostitele, jako je tomu u lidí (Abe et al., 1995; Rada et al., 2006; Voreades et al., 2014).

2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

2.1 Hypotéza

Dosavadní studie, zabývající se podáváním probiotik mláďatům přežvýkavců, jsou zaměřeny především na sledování váhového přírůstku a konverze krmiva, ale není sledováno skutečné přežívání podávaných probiotických kultur v trávicím traktu. Předpokládáme, že pokud bude vytvořeno synbiotikum, kde bude vhodně kombinován probiotický kmen s prebiotiky, dojde ke zlepšení přežívání dodaných bakterií v trávicím traktu, než kdyby byly podávány bakterie samostatně.

2.2 Cíle práce

Cílem doktorské práce bylo sestavit vhodné synbiotikum pro mláďata přežvýkavců, které bude snadno aplikovatelné v podmínkách velkochovů.

3 MATERIÁL A METODY

Hlavním úkolem dizertační práce bylo sestavení vhodného synbiotika pro telata, proto byl kladen důraz na správný výběr probiotických kmenů bifidobakterií a k nim vhodných prebiotik. Funkční kombinace synbiotika byla vybrána na základě několika *in vitro* a *in vivo* testů.

3.1 Testované kmeny bifidobakterií

Pro sestavení vhodného synbiotika byly použity bifidobakteriální kmeny, které jsou uložené ve sbírce mikroorganismů na katedře Mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU v Praze. Tyto kmeny byly izolovány z výkalů telat a byly u nich testovány probiotické vlastnosti jako je rezistence k žaludečním a žlučovým kyselinám, antimikrobiální aktivita a schopnost autoagregace. Kmeny byly identifikovány pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA (Bunešová et al., 2012; Vlková et al., 2010). Na základě provedených studií bylo vybráno 10 kmenů, u kterých byly testovány substrátové preference, a byly použity pro *in vivo* studie. Seznam kmenů a jejich zkratek, které jsou používány ve vědeckých publikacích je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Testované kmeny bifidobakterií izolované z výkalů telat.

označení kmene	druh
023II	*B. animalis* ssp. *animalis*
017III2	*B. thermophilum*
805P4	*B. animalis* ssp. *animalis*
012II1	*B. animalis* ssp. *animalis*
017III1	*B. animalis* ssp. *animalis*
022II	*B. longum* ssp. *suis*
805III2	*B. animalis* ssp. *animalis*
813P2	*B. animalis* ssp. *animalis*
023I2	*B. choerinum*
025II	*B. thermophilum*

3.2 Experimentální podávání probiotik a prebiotik

Z výše popsaných kmenů bifidobakterií byly připraveny rifampicin rezistentní mutanti (RRBif). Rezistence vůči rifampicinu je u bifidobakterií vzácná (Rada et al., 1995), proto bylo díky této získané vlastnosti možné rozlišit aplikované bakteriální kmeny od bifidobakterií, které se vyskytují v trávicím traktu telat přirozeně. V rámci dizertační práce bylo provedeno několik pokusů,

při kterých byly bifidobakterie podávány telatům, a bylo sledováno, jak v trávicím traktu přežívají. V každém provedeném pokusu byly po podání bifidobakterií odebírány vzorky výkalů telatům přímo z rekta v určitých časových intervalech. Vzorky byly převedeny do zkumavek s Wilkins-Chalgren bujónem a převezeny do laboratoře, kde bylo provedeno kultivační stanovení bakterií (publikace č. 1, č. 2, č. 3). Kromě RRBif byly ve vzorcích výkalů stanoveny i jiné bakteriální skupiny (celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterie, laktobacily a *E. coli*).

3.3 Vliv způsobu odchovu telat a rozdílné diety na přežívání podaných bifidobakterií v trávicím traktu telat

V tomto experimentu byl sledován vliv způsobu odchovu telat a typ diety na přežívání podaných bifidobakterií v trávicím traktu telat. Telatům byly podány 2 kmeny bifidobakterií (*B. animalis* subsp. *animalis* 023II a *B. longum* subsp. *suis* 022II) ve formě fermentovaného mléka. Byly sledovány dvě experimentální skupiny. První skupinu tvořila telata odchovávaná extenzivním způsobem (chov Charolais, Slabce) a druhou pak telata z intenzivního chovu (chov Dvorec, Vrčeňská zemědělská, Vrčeň). Podrobná metodika a získané výsledky byly publikovány ve vědeckém časopise Livestock Science (publikace č. 1).

3.4 Přežívání bifidobakterií v trávicím traktu telat po podání v lyofilizované formě nebo ve formě fermentovaného mléka

Probiotika mohou být podávána ve formě lyofilizovaného prášku, kde jsou bakterie živé, ale v neaktivní formě, nebo jako aktivní forma ve fermentovaném mléce. Byl testován vliv podávané formy probiotik na schopnost přežívání probiotických bakterií v trávicím traktu telat. Před vlastním experimentálním podáním probiotik telatům byly vybrané kmeny bifidobakterií testovány na odolnost procesu lyofilizace a na schopnost přežívání v kravském mléce. Následně byla směs všech 10 kmenů RRBif uvedených v tabulce č. 1 podána telatům z chovu Charolais spol. s.r.o. Byly vytvořeny tři skupiny, kdy první skupině telat bylo podáno probiotikum v lyofilizované formě, druhé skupině bylo podáno fermentované mléko a třetí skupina byla bez probiotik jako kontrola. Podrobná metodika a výsledky tohoto experimentu byly publikovány ve vědeckém časopise Czech Journal of Animal Science (publikace č. 2).

3.5 Vliv prebiotik na přežívání bifidobakterií v trávicím traktu

Substrátové preference bifidobakterií

Pro podporu rozvoje bifidobakterií v trávicím traktu telat byla vybrána vhodná prebiotika na základě substrátových preferencí. Růst čistých kultur bifidobakterií na různých komerčně dostupných prebioticích byl měřen pomocí turbidometrie. Ve stručnosti jde o metodu, kde je do zkumavek připraveno pěstebné prostředí, které obsahuje jako jediný zdroj uhlíku testované prebiotikum.

Testování vlivu prebiotik na přežívání bifidobakterií v GIT

V *in vivo* pokusu byly sledovány tři skupiny telat odchovávané v intenzivním chovu (Vražkov). První skupině telat bylo ve věku 2 dní podáno pouze fermentované mléko, které bylo prokysáno 5 kmeny vybraných bifidobakterií (017III1, 023II, 022II, 023I2, 025II). Druhé skupině telat bylo také jednorázově zkrmeno probiotikum, které bylo stejné jako u první skupiny, ale navíc jim každý den až do věku 49 dní byla podávána dvě prebiotika, která byla vybrána na základě substrátových preferencí, jednalo se o Raftilose P85 a Vivinal®. Bylo sledováno, zda prebiotické oligosacharidy podpoří přežívání podaných bifidobakterií. Třetí skupina bez intervence sloužila jako kontrola (podrobná metodika je součástí publikace č. 3, která vyšla v Animal Feed Science and Technology).

3.6 Vliv lupiny bílé v krmné dávce brojlerových kuřat a kachen na složení střevní mikrobioty

Lupina bílá (*Lupinus albus*) je potenciální alternativa za sóju ve výživě zvířat jako zdroj proteinu. Nejenom proteiny jsou důležitým růstovým faktorem. Lupina obsahuje významné množství nestravitelných sacharidů, zahrnující i oligosacharidy rafinosové řady (RSO). Tyto oligosacharidy mohou sloužit jako prebiotická složka v krmné dávce. Za účelem této studie byla stanovena množství RSO v extrahovaných šrotech sóji, slunečnice, řepky a lupiny. Přítomnost oligosacharidů byla stanovena enzymaticky pomocí soupravy Raffinose/Sucrose/D-Glucose Assay Kit (Megazyme; Ireland). Výsledky ukázaly, že množství RSO v testovaných plodinách jsou rozdílná, přičemž nejvyšší množství bylo stanoveno u lupiny. Následoval *in vivo* pokus, kde sójová mouka byla částečně (50 %) a celkově (100 %) nahrazena celozrnnou moukou z lupiny a byl sledován její vliv na vybrané skupiny střevních bakterií u brojlerových kuřat a kachen a zároveň vliv na jejich růstové parametry. Metodika a informace o pokusných zvířatech jsou uvedeny v publikaci č. 4.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Faktorů, které mohou ovlivnit přežívání podaných probiotických bakterií, je mnoho. Patří mezi ně například vhodně zvolený bakteriální kmen či směs kmenů, věk zvířete, dieta, vlastní způsob aplikace probiotik a další. Některé z těchto faktorů byly testovány v rámci dizertační práce. Vliv způsobu odchovu mláďat přežvýkavců a diety byl popsán v publikaci č. 1. Sledování přežívání probiotické směsi dvou kmenů bifidobakterií bylo provedeno u telat z extenzivního a intenzivního chovu. Počty RRBif stanovených ve vzorcích výkalů u obou skupin pokusných telat jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Počty RRBif (log KTJ/g ± SD; n=8) u telat z intenzivního a extenzivního chovu.

	počet RRBif	
věk	intenzivní chov	extenzivní chov
2	< 2,00	< 2,00
5	$7,46 \pm 0,47^{A}$	$9,77 \pm 0,66^{B}$
9	$5,17 \pm 0,64^{A}$	$9,56 \pm 0,30^{B}$
14	$4,97 \pm 1,16^{A}$	$8,97 \pm 0,86^{B}$
21	$3,80 \pm 2,17^{A}$	$8,93 \pm 0,56^{B}$
28	$2,40 \pm 0,80^{A}$	$7,19 \pm 1,60^{B}$

$^{A, B}$ rozdílné indexy v řádku značí významné rozdíly ($P < 0,05$)

Výsledky této studie ukázaly, že vybrané 2 kmeny bifidobakterií byly schopny projít horní částí trávicího traktu telat ve vysokých počtech v obou chovech. Nicméně přežívání podaných bakterií bylo lepší v extenzivním chovu telat, kde byly bifidobakterie schopny kolonizovat intestinální trakt nejméně po dobu 26 dní v počtech vyšších než 10^7 KTJ/g. Statisticky významně horší přežívání vykazovaly bifidobakterie, které byly podány telatům z intenzivního chovu. V počtech vyšších než 10^7 KTJ/g přežívaly pouze 3 dny po podání probiotické směsi a v následujících dnech jejich množství rychle klesalo. Zhoršené přežívání podaných bifidobakterií v trávicím traktu telat v intenzivním chovu by mohlo být způsobeno stresem, jako je například odebrání telat od matek. Podle Hawrelak and Myers (2004) může stres významně ovlivňovat složení mikrobioty GIT. Zatímco se množství zdraví prospěšných bakterií, jako jsou bifidobakterie a laktobacily, může snižovat, počty potenciálně patogenních bakterií, jako jsou *E. coli,* mohou vzrůstat. Tyto změny mohou být způsobeny zvýšenou produkcí norepinefrinu, který zvyšuje růst gramnegativních bakterií nebo změnou motility a sekrece intestinálního traktu (Sánchez et al.,

2013). To vše může vést ke snížení schopnosti podaných bifidobakterií přežívat v intestinálním traktu. Kromě stresu způsobeným vlivem odchovu telat může mít vliv na přežívání probiotických bakterií i dieta (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010; Simpson et al., 2002). Kravské mléko obsahuje široké spektrum různých bioaktivních látek, které mají imunomodulační, probiotickou nebo antimikrobiální funkci (Lane et al., 2010; Recio et al., 2009).

Probiotika mohou být aplikována samostatně nebo s krmivem či vodou. Společné podávání krmiva s probiotikem ale nese určité riziko možné interakce probiotických bakterií s komponenty krmiva (Gaggìa et al., 2010). Vlastní podávání probiotických bakterií může být provedeno několika formami. Obecně se dají rozdělit na dva typy a to na formu aktivní, která představuje například fermentované mléko a na formu neaktivní, kam se řadí například lyofilizované bakterie (Fasoli et al., 2003). Vliv formy podání probiotické směsi byl sledován v publikaci, která je uvedena jako č. 2. Protože mléko je vhodným substrátem pro bakterie (Quigley et al., 2013), jeden z možných způsobů jak podávat probiotika telatům je zkrmování fermentovaného mléka. Po fermentaci a během skladování by počet probiotických bakterií měl být vyšší než 10^6 KTJ/ml v prokysaném mléce, aby mohlo dojít k probiotickému efektu u daného hostitele (Vinderola et al., 2000). Všech 10 testovaných bifidobakterií bylo schopno prokysat kravské mléko ve vysokých počtech a to v rozmezí mezi 7,02 a 9,41 log KTJ/ml. Osm z deseti kmenů bylo schopno přežívat v kravském mléce minimálně po dobu 2 měsíců v počtech vyšších než 10^6 KTJ/ml. Výhodou fermentovaného mléka je jeho snížené pH, které do určité míry mléko konzervuje a telatům se lépe tráví (Bayram et al., 2007). Nevýhodou však zůstává jeho větší objem pro skladování oproti probiotikům, které jsou ve formě lyofilizovaného prášku.

Sledována byla i schopnost vybraných bifidobakterií přežívat proces lyofilizace a vydržet v této formě v nezměněných počtech po dobu 1 roku. Každý kmen byl lyofilizován v přibližném množství 10^9 KTJ/ml. Detekované množství bifidobakterií po lyofilizaci se pohybovalo v rozmezí 8,84 až 9,35 log KTJ/vialku. Množství lyofilizovaných bifidobakterií při skladování v pokojové teplotě bylo po celou dobu experimentu stabilní. Průměrné počty byly ve 3, 6, 9 a 12 měsících stanoveny na 8,80 ± 0,13; 8,78 ± 0,38; 8,80 ± 0,47 a 8,93 ± 0,50 log KTJ/vialku. Díky stále širšímu zájmu o využívání probiotik v chovech skotu je kladen důraz na vysokou životaschopnost bakterií během skladování. Jedním z vhodných způsobů uchování probiotických bakterií je právě testovaná lyofilizace (Carvalho et al., 2004), ale i tento proces může někdy způsobit ztrátu životaschopnosti některých bakterií kvůli krystalkům, které se vytvářejí během procesu mražení před vlastní lyofilizací a mohou tak způsobit popraskání buněčných membrán (Poddar et al., 2014).

Dalším krokem bylo podávání obou forem probiotické směsi telatům ve věku 2 dní. Počty RRBif (tabulka č. 3) byly sledovány v průběhu 61 dní ve výkalech telat u obou pokusných skupin a kontroly.

Tabulka č. 3: Počty RRBif (log KTJ/g ± SEM; n=8) u telat krmených fermentovaným mlékem (FM), lyofilizovanými bakteriemi (LB) a u kontrolní skupiny telat bez probiotik (K).

	věk telat (dny)							
	2	5	10	14	21	35	49	63
FM	< 2,00	9,79 ± 0,32	9,41 ± 0,14	9,15 ± 0,00	8,86 ± 0,52	7,33 ± 0,19	5,78 ± 0,03	5,29 ± 0,58
LB	< 2,00	9,60 ± 0,35	9,29 ± 0,15	9,15 ± 0,23	9,13 ± 0,14	8,04 ± 0,16	6,00 ± 0,12	5,55 ± 0,34
K	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00

Mezi skupinami LB a FM nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Rochet et al. (2007) sledoval přežívání kmene *B. animalis* u dospělých jedinců po podání ve formě fermentovaného mléka a lyofilizovaného prášku. Přežívání sledovaného kmene bylo shodné v obou formách podání. Podle našich výsledků byly nalezeny statisticky nevýznamné rozdíly v přežívání bifidobakterií podaných v různých formách. Tento malý rozdíl byl pravděpodobně způsoben formou podání, kde lyofilizované bakterie potřebovaly čas na reaktivaci v GIT telat. Rychlost obnovy bakterií z lyofilizované formy do aktivní formy mohou ovlivnit podmínky trávicího traktu, jako jsou pH, osmotické podmínky a dostupnost vhodného zdroje energie (Costa et al., 2000). Výsledky ukázaly, že obě formy podání probiotických bakterií jsou vhodné. Podané bifidobakterie byly detekovány u obou skupin v GIT telat nejméně po dobu 63 dní od vlastní aplikace probiotik. Z praktického pohledu komerčního využití v chovech skotu se ale zdá být vhodnější lyofilizovaná forma probiotik.

Pro zvýšení účinku probiotik je vhodné současně podávat i prebiotika. Prebiotické substráty by měly být specifické pro probiotické bakterie a měly by pozitivně stimulovat jejich přežívání a aktivitu v intestinálním traktu, zároveň by měly zvyšovat počty prospěšných bakterií již přítomných v GIT hostitele (Konar et al., 2016). Většina studií zabývající se podporou probiotických bakterií prebiotiky je provedena v *in vitro* podmínkách, kde je především sledováno, zda prebiotika zvyšují schopnost bakterií přežívat v prostředí s velmi nízkým pH nebo při vysoké koncentraci žlučových kyselin, které představují podmínky GIT (Adebola et al., 2014; Michida et al., 2006). Skutečnost, zda jsou prebiotika schopna podpořit dlouhodobé přežívání podaných probiotických bakterií ve střevě mladých přežvýkavců, nebyla dosud zkoumána *in vivo*. Cílem studie uvedené v publikaci č. 3 bylo vybrat vhodná komerčně dostupná prebiotika, která by mohla být použita jako substrát pro

bifidobakterie původně izolované z trávicího traktu telat a sledovat vliv podávání prebiotik na přežívání podaných bifidobakterií dvoudenním telatům v intenzivním odchovu.

Na základě získaných výsledků z testování substrátových preferencí byly jako prebiotická složka vybrány Vivinal® a Raftilosa P85. Jedná se o komerčně dostupná prebiotika. Výsledky podávání probiotik a probiotik v kombinaci s prebiotiky telatům jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Počty RRBif (log KTJ/g ± SD; n=5) u telat, kterým byla jednorázově podána pouze probiotika (PROB), u telat, která dostala jednorázově probiotika v kombinaci s prebiotiky a každý následující den prebiotika (SYNB) a počty RRBif u kontrolní skupiny.

	věk telat (dny)					
	2	4	10	21	28	49
PROB	< 2,00	$7,28 \pm 0,54^{A}$	$6,32 \pm 0,85^{A}$	$5,02 \pm 1,03^{A}$	$4,55 \pm 1,05^{A}$	$3,74 \pm 2,18^{A}$
SYNB	< 2,00	$8,42 \pm 0,77^{B}$	$7,21 \pm 0,83^{A}$	$5,58 \pm 0,95^{A}$	$5,76 \pm 1,66^{A}$	$4,15 \pm 1,03^{A}$
Kontrola	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00	< 2,00

$^{A, B}$ rozdílné indexy ve sloupci značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

Stejně jako v předchozích experimentech byly RRBif schopny projít horní částí trávicího traktu v obou testovaných skupinách a u 4denních telat byly detekovány v počtech 7,28 ± 0,54 log KTJ/g u probiotické skupiny a v počtech 8,42 ± 0,77 log KTJ/g u synbiotické skupiny telat. Tento statisticky významný rozdíl naznačuje, že prebiotika zlepšují přežívání podaných bifidobakterií během průchodu horní částí GIT. To je v souladu s výsledky *in vitro* studií, kde prebiotika podpořila přežívání bakterií během simulujících gastrointestinálních podmínek (Adebola et al., 2014; And and Kailasapathy, 2005; Michida et al., 2006). Vyšší počty RRBif byly detekovány u skupiny telat, kterým byla podávána prebiotika ve srovnání s počty RRBif u telat bez prebiotické intervence a to po celou dobu studie, nicméně již bez statisticky významného rozdílu.

Prebiotika jsou přirozenou složkou některých rostlin, kde slouží jako zdroj sacharidů nebo jako osmoticky aktivní látky (Paradiso et al., 2008). Obiloviny a luštěniny jsou běžnou součástí krmiva pro hospodářská zvířata a mohou obsahovat významné množství různých typů oligosacharidů. Například oligosacharidy rafinosové řady (RSO) jsou běžně přítomné v luštěninách a obiloviny jsou přírodním zdrojem fruktooligosacharidů (Guillon and Champ, 2002; Paradiso et al., 2008). Pokud jsou oligosacharidy obsaženy ve významném množství v plodinách určených pro krmivářský průmysl, mohou se stát nezanedbatelnou složkou krmiva, která může mít vliv na složení střevní mikrobioty hostitele.

Vlivem přídavku lupiny (*Lupinus albus*) do krmiva brojlerových kuřat a kachen na složení střevní mikrobioty se zabývá studie uvedená jako č. 4. V současné době je lupina považována za vhodný zdroj proteinů pro zvířata a měla by sloužit jako náhrada za sóju, která je importována ze zaoceánských zemí. Mezi další potenciální zdroje dietárního proteinu patří extrahované šroty ze slunečnice nebo řepky (Dadalt et al., 2016; Liermann et al., 2016). Při stanovení RSO se ukázalo, že, lupina obsahovala nejvyšší množství RSO ze všech sledovaných plodin a to 8,26 ± 0,14 g/100 g, poměrně vysoké množství RSO obsahovala i sója (6,96 ± 0,21 g/100g). Naopak malé množství RSO oproti luštěninám obsahovaly slunečnice (1,73 ± 0,26 g/100g) a řepka (1,79 ± 0,14 g/100g). Následoval *in vivo* pokus, kde byl sójový šrot nahrazen 50 % nebo 100 % lupinovým šrotem v krmné dávce brojlerových kuřat a kachen. Byl sledován vliv lupiny na vybrané bakteriální skupiny trávicího traktu a na růstové parametry zvířat. Zahrnutí lupinového šrotu do krmné dávky brojlerových kuřat neovlivnilo počty bakterií ve voleti, ale kompletní náhrada lupiny za sóju významně zvýšila počty laktobacilů ve slepém střevu kuřat. U kachen byly detekovány významně vyšší počty bifidobakterií a laktobacilů oproti kontrole jak při 50% tak i při 100% nahrazením sóji lupinovým šrotem. Kompletní náhrada sóji lupinovým šrotem však měla negativní efekt na živou váhu kuřat i kachen. Zařazení lupiny bílé do krmné dávky drůbeže pozitivně ovlivnilo složení střevní mikrobioty. Podobných výsledků dosáhl i Zdunczyk et al. (2014), který pozoroval zvýšení počtů bifidobakterií po 20% přídavku lupiny modré do krmné dávky nosnic. Zařazení lupiny žluté do krmiva krůt a krocanů nezvýšilo počty laktobacilů (Zdunczyk et al., 2016).

5 ZÁVĚRY

Schopnost přežívání podaných bifidobakterií v trávicím traktu je vyšší u telat na mléčné dietě než u telat na kombinované dietě.

Bifidobakterie podané telatům jak ve formě fermentovaného mléka, tak ve formě lyofilizované, byly schopny přežívat v trávicím traktu v podobných množstvích. Z praktického pohledu komerčního využití v chovech skotu se proto zdá být vhodnější lyofilizovaná forma probiotik.

Podařilo se nalézt kombinaci probiotik a prebiotik, která podporuje přežívání podaných bifidobakterií a zvyšuje počty přirozeně se vyskytujících bifidobakterií.

Lupinový šrot obsahoval nejvyšší množství oligosacharidů rafinosové řady oproti jiným plodinám používaným jako zdroj proteinu pro zvířata. Zařazení lupiny do krmné dávky drůbeže pozitivně ovlivnilo složení střevní mikrobioty, ale kompletní náhrada sóji za lupinu měla negativní efekt na živou hmotnost zvířat.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abe, F., Ishibashi, N., Shimamura, S., 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. J. Dairy Sci. 78, 2838–2846.

Adebola, O.O., Corcoran, O., Morgan, W.A., 2014. Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. J. Funct. Foods 10, 75–84.

And, C.I., Kailasapathy, K., 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under *in vitro* acidic and bile salt conditions and in yogurt. J. Food Sci. 70, M18–M23.

Bayram, B., Yanar, M., Güler, O., Metin, J., 2007. Growth performance, health and behavioural characteristics of Brown Swiss calves fed a limited amount of acidified whole milk. Ital. J. Anim. Sci. 6, 273–279.

Bunešová, V., Domig, K.J., Killer, J., Vlková, E., Kopečný, J., Mrázek, J., Ročková, Š., Rada, V., 2012a. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. Anaerobe 18, 166–168.

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 14, 835–847.

Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. Benef. Microbes 1, 3–9.

Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Garcia, N., Viñas, I., 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of Pantoea agglomerans strain CPA-2 subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol. 89, 793–800.

Dadalt, J.C., E. Velayudhan, D., Neto, M.A.T., Slominski, B.A., Nyachoti, C.M., 2016. Ileal amino acid digestibility in high protein sunflower meal and pea protein isolate fed to growing pigs with or without multi-carbohydrase supplementation. Anim. Feed Sci. Technol. 221, 62–69.

De Preter, V., Hamer, H.M., Windey, K., Verbeke, K., 2011. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? Mol. Nutr. Food Res. 55, 46–57.

FAO/WHO, 2013 in Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C, Sanders, M.E., 2014. The international Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 11, 506-514.

Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., Torriani, S., 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. Int. J. Food Microbiol. 82, 59–70.

Frizzo, L.S., Zbrun, M. V., Soto, L.P., Signorini, M.L., 2011. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. Anim. Feed Sci. Technol. 169, 147–156.

Gaggìa, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int. J. Food Microbiol. 141, S15–S28.

Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J. Van, Rastall, R.A., Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutr. Res. Rev. 17, 259.

Guillon, F., Champ, M.M.-J., 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. Br. J. Nutr. 88 Suppl 3, S293–S306.

Hawrelak, J.A., Myers, S.P., 2004. The causes of intestinal dysbiosis: a review. Altern. Med. Rev. 9, 180–97.

Konar, N., Toker, O.S., Oba, S., Sagdic, O., 2016. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. Trends Food Sci. Technol. 49, 35–44.

Lane, J.A., Mehra, R.K., Carrington, S.D., Hickey, R.M., 2010. The food glycome: A source of protection against pathogen colonization in the gastrointestinal tract. Int. J. Food Microbiol. 142, 1–13.

Leser, T.D., Mølbak, L., 2009. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. Environ. Microbiol. 11, 2194–206.

Liermann, W., Berk, A., Böschen, V., Dänicke, S., 2016. Effects of diets differing in protein source and technical treatment on digestibility, performance and visceral and biochemical parameters of fattening pigs. Arch. Anim. Nutr. 70, 190–208.

Manning, T.S., Gibson, G.R., Link-Amster, H., 2004. Prebiotics. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 18, 287–298.

Mellado, M., Lopez, E., Veliz, F.G., De Santiago, M.A., Macias-Cruz, U., Avendaño-Reyes, L., Garcia, J.E., 2014. Factors associated with neonatal dairy calf mortality in a hot-arid environment. Livest. Sci. 159, 149–155.

Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S.S., Webb, C., Fukuda, H., Kondo, A., 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. Biochem. Eng. J. 28, 73–78.

Morrison, S.J., Dawson, S., Carson, A.F., 2010. The effects of mannan oligosaccharide and *Streptococcus faecium* addition to milk replacer on calf health and performance. Livest. Sci. 131, 292–296.

Paradiso, A., Cecchini, C., Greco, E., D'Egidio, M.G., De Gara, L., 2008. Variation in fructooligosaccharide contents during plant development and in different cultivars of durum wheat. Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol. 142, 656–660.

Poddar, D., Das, S., Jones, G., Palmer, J., Jameson, G.B., Haverkamp, R.G., Singh, H., 2014. Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. Int. Dairy J. 39, 1–7.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol. Rev. 37, 664–98.

Rada, V., Marounek, M., Rychlý, I., Šantrůčková, D., Vořišek, K., 1995. Effect of *Lactobacillus salivarius* administration on microflora in the crop and caeca of broiler chickens. J. Anim. Feed Sci. 4, 161–170.

Rada, V., Vlková, E., Nevoral, J., Trojanová, I., 2006. Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. FEMS Microbiol. Lett. 258.

Recio, I., Moreno, F.J., López-Fandiño, R., 2009. Glycosylated dairy components: Their roles in nature and ways to make use of their biofunctionality in dairy products, in: Dairy-Derived Ingredients. Elsevier, pp. 170–211.

Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Ledaire, A., Andrieux, C., Sutren, M., Rabot, S., Mogenet, A., Bresson, J.-L., Cools, S., Picard, C., Goupil-Feuillerat, N., Doré, J., 2007. Survival of Bifidobacterium animalis DN-173 010 in the faecal microbiota after administration in lyophilised form or in fermented product – a randomised study in healthy adults. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 14, 128–136.

Roodposhti, P.M., Dabiri, N., 2012. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of Escherichia coli, and immune system status in newborn female calves. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 25, 1255–61.

Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., 2013. Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. Pharmacol. Res. 69, 127–136.

Simpson, J.M., Martineau, B., Jones, W.E., Ballam, J.M., Mackie, R.I., 2002. Characterization of Fecal Bacterial Populations in Canines: Effects of Age, Breed and Dietary Fiber. Microb. Ecol. 44, 186–197.

Vinderola, C.., Bailo, N., Reinheimer, J.., 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian

yoghurts during refrigerated storage. Food Res. Int. 33, 97–102.

Vlková, E., Grmanová, M., Killer, J., Mrázek, J., Kopečný, J., Bunešová, V., Rada, V., 2010. Survival of bifidobacteria administered to calves. Folia Microbiol. 55, 390–392.

Voreades, N., Kozil, A., Weir, T.L., 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. Front. Microbiol. 5, 494.

Zdunczyk, Z., Jankowski, J., Rutkowski, A., Sosnowska, E., Drazbo, A., Zdunczyk, P., Juskiewicz, J., 2014. The composition and enzymatic activity of gut microbiota in laying hens fed diets supplemented with blue lupine seeds. Anim. Feed Sci. Technol. 191, 57–66.

Zdunczyk, Z., Krawczyk, M., Mikulski, D., Jankowski, J., Przybylska-Gornowicz, B., Juskiewicz, J., 2016. Beneficial effects of increasing dietary levels of yellow lupine (*Lupinus luteus*) seed meal on productivity parameters and gastrointestinal tract physiology in eight-week-old turkeys. Anim. Feed Sci. Technol. 211, 189–198.

7 SEZNAM PUBLIKACÍ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE

Články ve vědeckých časopisech s IF

Bunešová, V., Vlková, E., **Geigerová, M.,** Rada, V. 2015. Effect of rearing systems and diets composition on the survival of probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves. Livestock Science. 178, 317-321. (publikace č. 1)

Geigerová, M., Vlková, E., Bunešová, V., Rada, V. 2016. Persistence of bifidobacteria in the intestines of calves after administration in freeze-dried form or in fermented milk. Czech Journal of Animal Science. 61, 49-56. (publikace č. 2)

Geigerová, M., Bunešová, V., Vlková, E., Salmonová, H., Rada, V. 2017. Selection of prebiotic oligosaccharides suitable for synbiotic use in calves. Animal Feed Science and technology. 229, 73 – 78. (publikace č. 3)

Geigerová, M., Švejstil, R., Skřivanová, E., Straková, E., Suchý, P. 2017. Effect of dietary lupin (*Lupinus albus*) on the gastrointestinal microbiota composition in broiler chickens and ducks. Czech Journal of Animal Science. Předloženo do Czech Journal of Animal Science. (publikace č. 4)

Bunešová, V., Musilová, Š., **Geigerová, M.,** Pechar, R., Rada, V. 2015. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. Journal of Microbiological Methods. 109, 106 – 109.

Vlková, E., Salmonová, H., Bunešová, V., **Geigerová, M.,** Rada, V. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. Anaerobe. 34, 27 – 33.

Recenzované vědecké publikace

Geigerová, M., Vlková, E., Skřivanová, E., Bunešová, V. 2014. Odlišnosti v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců. Veterinářství. 7, 523 – 526.

Bunešová, V., **Geigerová, M.,** Vlková, E. 2015. Bifidobakterie jako možná probiotika pro mláďata přežvýkavců. Veterinářství. 7, 528 – 532.

Příspěvky na konferencích

Geigerová, M., Švejstil, R., Skřivanová, E., Kodešová, T., Rada, V. Influence of Raffinose-series oligosaccharides isolated from lupin (Lupinus albus) on intestinal microbiota of broiler chicken. 25th international ICFMH conference – FoodMicro, Dublin, Ireland, July 19-22, **2016.**

Skřivanová, E., **Geigerová, M**., Švejstil, R., Rada, V. The effect of dietary white lupin (Lupinus albus) seeds on intestinal microbiota. 4th International ISEKI_Food Conference, Vienna, Austria, July 6 – 8, 415, **2016.**

Bunešová, V., **Geigerová, M**., Rada, V. The influence of diet on the occurrence of bifidobacteria and lactobacilli. 8th probiotics, prebiotics and new foods for microbiota and human health, Rome, Italia, September 13-15, 120, **2015**.

Salmonová, H., **Geigerová, M.,** Vlková, E., Bunešová, V., Rada, V. Norfloxacin as a selective factor in solid cultivation media for bifidobacteria isolation from faecal samples. Probiotics, a proactive approach to health. International Yakult Symposium, Berlin, Germany, April 23-24, 35, **2015.**

Geigerová M., Vlková E., Bunešová V., Rada V.: Growth and survival of bifidobacteria in cow, sheep and goat milks. Book of abstracts of International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics, Budapest, Hungary, June 24-26, 93-94, **2014**, ISBN 978-8089589-09-8.