

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Synbiotika pro mláďata přežvýkavců

Dizertační práce

Doktorand: **Ing. Martina Geigerová**

Školitel: **prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.**

Konzultant: **Ing. Věra Bunešová, Ph.D.**

Praha 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou dizertační práci na téma „Synbiotika pro mláďata přežvýkavců“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího dizertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury.

Datum

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné vedení během doktorského studia, za cenné rady a věcné připomínky a především za ochotu, vstřícnost a všestrannou podporu. Ráda bych poděkovala i celé katedře Mikrobiologie, výživy a dietetiky, která se mi během mého studia stala druhou rodinou.

Obsah

1	Úvod	6
2	Současný stav problematiky	7
2.1	Střevní mikrobiota.....	7
2.1.1	Mikrobiota jednotlivých částí GIT	9
2.1.2	Funkce střevní mikrobioty.....	12
2.2	Střevní mikrobiota mláďat přežvýkavců.....	15
2.2.1	Složení a vývoj střevní mikrobioty mláďat přežvýkavců	15
2.2.2	Odchov a výživa telat	17
2.2.2.1	Mlezivové období.....	18
2.2.2.2	Mléčné období.....	19
2.2.3	Rozdíl ve výživě telat v extenzivním a intenzivním chovu.....	20
2.3	Probiotika	22
2.3.1	Vlastnosti probiotických bakterií	22
2.3.2	Probiotika ve výživě zvířat.....	25
2.3.3	Rod <i>Bifidobacterium</i>	28
2.3.3.1	Charakteristika a kultivační podmínky.....	28
2.3.3.2	Metabolismus bifidobakterií.....	29
2.4	Prebiotika	31
2.4.1	Fruktooligosacharidy a inulin.....	32
2.4.2	Galaktooligosacharidy.....	33
2.4.3	Sójové oligosacharidy	33
2.5	Synbiotika	34
3	Hypotéza.....	36
4	Cíle práce.....	36

5	Materiál a metody.....	37
5.1	Testované kmeny bifidobakterií.....	37
5.2	Experimentální podávání probiotik a prebiotik.....	38
5.2.1	Vliv způsobu odchovu telat a rozdílné diety na přežívání podaných bifidobakterií v trávicím traktu telat.....	38
5.2.2	Přežívání bifidobakterií v trávicím traktu telat po podání v lyofilizované formě nebo ve formě fermentovaného mléka.....	38
5.2.3	Vliv prebiotik na přežívání bifidobakterií v trávicím traktu	39
5.2.3.1	Substrátové preference bifidobakterií	39
5.2.3.2	Testování vlivu prebiotik na přežívání bifidobakterií v GIT	39
5.3	Vliv lupiny bílé v krmné dávce brojlerových kuřat a kachen na složení střevní mikrobioty	40
6	Výsledky a diskuze.....	41
7	Závěry.....	52
8	Seznam použité literatury	53
9	Přílohy	69
9.1	Příloha č. 1:	71
9.2	Příloha č. 2:	76
9.3	Příloha č. 3:	84
9.4	Příloha č. 4:	90
9.5	Příloha č. 5:	108
9.6	Příloha č. 6:	113
9.7	Příloha č. 7:	118
9.8	Příloha č. 8:	122

1 Úvod

Gastrointestinální trakt 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. 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. 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. Od této doby jsou hledány nové způsoby ovlivnění a podpory střevní mikrobioty trávicího traktu hospodářských zvířat. Jednou z možností jak podpořit rovnováhu mikrobiálního společenství a tím podpořit zdraví zvířete je podávání probiotik a prebiotik.

V současné době se používá jako probiotika pro hospodářská zvířata řada bakteriálních rodů. Mezi bakterie, které se běžně používají v Evropské unii jako krmná aditiva, patří především grampozitivní bakterie rodu *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. U některých bakteriálních druhů je jejich pozitivní efekt na hostitele sporný (*E. coli*, *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp.), naopak mezi jednoznačně pozitivně působící bakteriální rody patří bifidobakterie a laktobacily. Při výběru nových kmenů je vhodné dbát na to, že mohou být hostitelsky specifické, proto je vhodné jako probiotika využívat bakterie izolované z živočišného druhu, kterému jsou určena. Díky této vlastnosti se zvyšuje šance kolonizace trávicího traktu. Probiotika se mohou podávat společně s prebiotiky, tato kombinace se nazývá synbiotika. Prebiotika jsou hostitelem nestravitelné látky, které jsou selektivně metabolizovány střevními bakteriemi a tím podporují jejich rozvoj. Díky kombinaci obou složek dochází k synergickému účinku a zlepšuje se tak přežívání a kolonizace probiotických bakterií. Jelikož komerčně dostupná prebiotika mohou podporovat kromě probiotických bakterií i jiné střevní bakterie, je vhodné testovat substrátové preference potenciálně probiotických kmenů a sestavit tak nové funkční synbiotikum.

2 Současný stav problematiky

2.1 Střevní mikrobiota

Všechna zvířata jsou hostiteli celé řady rozličných prokaryotických a eukaryotických symbiontů, což přináší určité fyziologické výhody. Interakce mezi mikro- a makroorganismem je důležitá zejména v gastrointestinálním traktu (GIT). Přirozená střevní mikrobiota je složena z bakterií, plísní, virů a archeí, avšak bakterie jsou nejvíce početnou skupinou (Hollister et al., 2014). Střevní mikrobiota savců je složena z 500 – 1000 různých bakteriálních druhů a většina z nich patří do dvou kmenů, Bacteroides a Firmicutes (Leser and Mølbak, 2009). I když je savčí GIT osídlen bakteriemi patřícími především do dvou hlavních kmenů, rodová a druhová diverzita, zejména u savců, je obrovská. Celá řada bakteriálních druhů byla nalezena jak v trávicím traktu lidí, tak u různých dalších savců, ale některé bakterie jsou hostitelsky specifické a byly nalezeny pouze u konkrétních živočišných druhů. Přítomnost určitých bakteriálních druhů není dána pouze druhem zvířete. Odlišnosti ve složení střevní mikrobioty v rámci jednoho živočišného druhu mohou být způsobeny i rozdílným způsobem porodu, složením stravy, životním stylem, stravovacími návyky, věkem, genetickou výbavou hostitele a dalšími jinými faktory jako jsou léčba antibiotiky nebo prodělání střevní infekce a zánětlivá střevní onemocnění (Yoon et al., 2015). Na rozdíl od savců nebo jiných obratlovců byla nalezena daleko menší bakteriální diverzita u bezobratlých živočichů (Yun et al., 2014). Naopak největší rozmanitost ve složení střevní mikrobioty byla nalezena u mořských býložravců (Nelson et al., 2013). Z biomedicínského hlediska vysoká diverzita bakteriálního osídlení v trávicím traktu je spojována se zdravím jedince. Byly provedeny studie u myši a lidí, kde bylo zjištěno, že mikrobiota s nízkou diverzitou predikovala zvýšené riziko rozvoje různých zánětlivých onemocnění (Hansen et al., 2014; Hildebrand et al., 2013).

Vývoj mikrobioty trávicího traktu saveců začíná okamžikem porodu, kdy je sterilní trávicí trakt mláďate osidlován přirozenou mikrobiotou matky a okolním prostředím (Leahy et al., 2005). Mláďata zvířat přicházejí do styku s matčinými výkaly a intestinální bakterie přijímají i během sání mateřského mléka. U všech živočišných druhů probíhá střevní kolonizace podobně. Po narození se navyšují počty bakterií, dokud se nevytvoří relativně stabilní mikrobiota. Tento proces je ovlivněn různými faktory, jako jsou způsob porodu, délka těhotenství, způsob krmení a okolní prostředí (Dogra et al., 2015). Jelikož trávicí trakt těsně

po porodu obsahuje kyslík, první bakterie, které kolonizují střevo, jsou fakultativně anaerobní bakterie. Přibližně do 24 hodin jsou při běžném průběhu vývoje mikrobioty nahrazeny převážně anaerobními bakteriemi. Obecně platí, že prvních 24 hodin dochází k významným změnám ve složení střevní mikrobioty. Většinu bakteriálních rodů, které jsou dominantní během prvních dnů života, nahradí později jiné rody. Zhruba po šesti měsících se u zvířat vyvine stabilní střevní mikrobiota dospělého typu, u lidí je tento proces obvykle delší a trvá 2-3 roky (Palmer et al., 2007). Zásadní vliv na změnu bakteriální populace ve střevech savců má ukončení mléčné výživy. I když je velmi obtížné definovat "normální" střevní mikrobiotu, z vědeckých studií vyplývá, že hlavní bakteriální kmeny, které jsou přítomny v trávicím traktu, jsou kmeny Firmicutes (zastoupen především rody *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Ruminococcus* a *Lactobacillus*) a Bacteroidetes (zastoupen především rody *Bacteroides* a *Prevotella*). Ostatní kmeny jako Actinobacteria (*Bifidobacterium* sp.), Proteobacteria (*Grammaproteobacteria* sp. a *Enterobacteriaceae* sp.) nebo Verrucomicrobia (*Akkermansia* sp.) bývají přítomny v nižších počtech, ale přesto ovlivňují, ať už pozitivně nebo negativně, zdraví jedince (Leser and Mølbak, 2009; Matamoros et al., 2013). Například bifidobakterie patří mezi jednoznačně prospěšné bakterie a některé druhy jsou používány jako probiotika. Další pozitivně působící bakterií je *Akkermansia muciniphila*, která je běžnou součástí střevní mikrobioty savců a v nejvyšších počtech je nalézána u býložravců. *A. muciniphila* patří mezi mucin-degradující bakterie a podporuje imunitní odpověď hostitele (Derrien et al., 2011). Naopak do třídy *Grammaproteobacteria* patří některé bakteriální druhy, které jsou patogenní a mohou způsobovat vážná onemocnění. Jedná se například o *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *Vibrio* sp. a *Pseudomonas* sp.

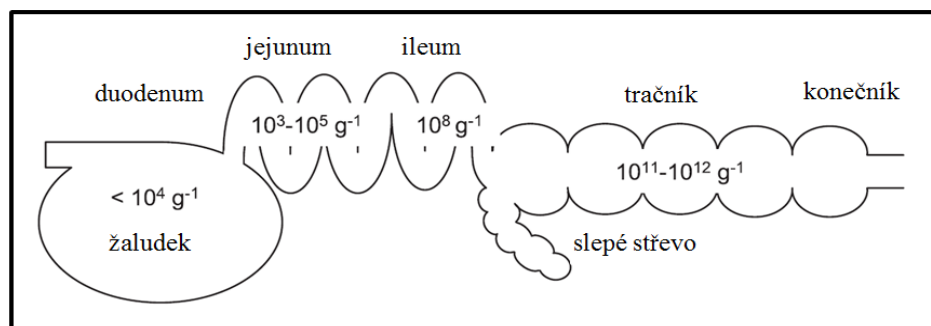
Velké projekty zaměřené na studium lidského mikrobiomu jako Human microbiome project a Metagenomics of the Human Intestinal Tract napomohly prohloubení znalostí o složení lidské střevní mikrobioty. Díky těmto projektům byly definovány na základě metagenomického sekvenování tři základní skupiny lidských střevních mikrobiomů, tzv. enterotypy. Enterotypy jsou nazývány podle skupiny bakterií, které v daném mikrobiomu dominují a to: *Bacteroides*, *Prevotella* a nebo *Ruminococcus*. Podle druhu diety se dají dva ze tří zmíněných enterotypů předurčit. Enterotyp *Bacteroides* je spojován s dietou západních zemí, která je charakteristická vysokým obsahem bílkovin a tuku v potravě, naopak enterotyp *Prevotella* mívají lidé, kteří konzumují vysoký podíl rostlinné stravy (Voreades et al., 2014).

Se zvyšujícím se věkem dochází ke změnám ve složení a funkci střevní mikrobioty. Dochází ke snižování počtu některých bakteriálních rodů (*Bifidobacterium* sp. a *Bacteroides* sp.), které mají protektivní funkci. Významně se mění i poměr bakterií patřících do kmenů Firmicutes a Bacteroidetes, kdy se s věkem zvyšuje počet bakterií patřící do kmene Bacteroidetes (Mariat et al., 2009). Z vědeckých studií ale vyplývá, že spíše než věk, ovlivňují bakteriální změny v trávicím traktu dieta, okolní prostředí, obezita nebo různá gastrointestinální onemocnění (O'Connor et al., 2014).

2.1.1 Mikrobiota jednotlivých částí GIT

Mikrobiální složení (druhové zastoupení a množství mikroorganismů) trávicího traktu je v jeho jednotlivých částech rozdílné (obrázek č. 1). Mechanické a enzymatické trávení potravy začíná v ústech, kde jsou přítomné různé druhy bakterií, virů a plísní. Mezi typické zástupce ústní mikrobioty patří rody *Streptococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus* a *Micrococcus*, v ústní dutině psů byl nalezen ve vysokém počtu i například rod *Pseudomonas* (Manuel et al., 2014). O složení ústní mikrobioty přežvýkavců nejsou k dispozici žádné vědecké studie, protože většina odborných textů souvisí se vznikem zubního kazu u lidí nebo jsou studie zaměřené na zvířecí kousnutí a následné infekce. Obecně ale platí, že většinu bakteriálních druhů lze považovat za komenzály ústní dutiny, kteří vytváří poměrně stabilní biofilm, jenž je odolný proti mechanickému namáhání a antibiotické léčbě (Avila et al., 2009).

Obrázek č. 1: Znázornění počtu bakterií v jednotlivých částech trávicího traktu monogastrických savců (Leser and Mølbak, 2009).



Trávicí trakt savců pokračuje přes hltan a jícen do žaludku, kde jsou pak zásadní rozdíly ve fyziologii trávicího traktu a tedy i v trávení potravy mezi monogastry a přežvýkavci. U přežvýkavců je nejdříve potrava fermentována mikroorganismy v bachoru a až poté je trávena v tenkém a tlustém střevě. Enzymatické trávení zvířete nastupuje až po fermentaci a jsou jím stráveni i prvoci a bakterie, zatímco u monogastrů probíhá hlavní fermentace až v tlustém střevě. Dokud jsou mláďata přežvýkavců na mléčné výživě, není vyvinutý bachor a jejich fyziologie trávení je shodná s trávením potravy monogastrického zvířete.

Díky sekreci žaludeční šťávy do žaludku se pH po smíchání s potravou pohybuje v rozmezí 2 - 4 (ale i 1). Nízké pH v žaludku má baktericidní účinek a je jedním z neúčinnějších obran těla proti patogenům, které se do těla dostanou s jídlem nebo vodou. Například bakterie *Vibrio cholerae* je citlivá na nízké pH žaludku a tak k propuknutí onemocnění může dojít po pití a používání vody, která obsahuje 10^6 KTJ/ml. Jiné mikroorganismy jsou však tolerantní k nízkému pH a mohou tak přežít průchod žaludkem a jejich infekční dávka je pak malá (i 10^1 KTJ/ml). Mezi takové patogenní bakterie patří některé druhy *Salmonella* sp., *Shigella* sp. a známý sérotyp enterohemoragické *E. coli* O157:H7 (Tuohy and Del Rio, 2014). I když nepříznivé prostředí žaludku zabraňuje přežívání většiny druhů bakterií, některé jsou zde přítomny a to v množství $10^2 - 10^4$ KTJ/g. Asi nejznámější bakterií obývajících žaludeční prostředí lidí i zvířat je podmíněný patogen *Helicobacter pylori*, který může být původcem různých gastritid (Leser and Mølbak, 2009; Walker and Talley, 2014). Některá monogastrická zvířata, příkladem jsou koně a prasata, mají ve skvamózní části žaludku poměrně vysoký počet laktobacilů (Barrow et al., 1980; Yuki et al., 2000). Mezi další bakterie často přítomné v žaludku patří *Streptococcus* sp., *Actinomyces* sp., *Prevotella* sp. a *Gemella* sp., ale Tuohy and Del Rio (2014) připouští, že je poměrně problematické rozlišit bakterie, které jsou přítomné v žaludku přirozeně a bakterie, které se sem dostaly z jícnu nebo z orální dutiny.

Naopak vysoké počty mikroorganismů jsou přítomny v bachoru přežvýkavců, počty prokaryotických a eukaryotických organismů dosahují množství až 10^{11} KTJ/g. Hlavní skupinou jsou bakterie, které jsou přítomné v počtech $10^{10} - 10^{11}$ KTJ/g, dále prvoci $10^5 - 10^6$ KTJ/g a přítomné jsou i kvasinky, fágy a anaerobní houby (Wallace and Newbold, 1992). V bachoru jsou nejvíce zastoupeny bakterie kmenů Bacteroidetes a Firmicutes, v minoritním množství jsou přítomny bakterie kmenů Proteobacteria, Actinobacteria a Tenericutes.

Zastoupení bakterií v bachoru se značně liší mezi jedinci. Například bakterie kmene Bacteroidetes jsou v počtech velmi variabilní, jejich zastoupení se pohybuje v rozmezí od 26 % do 70 % (Jami et al., 2012). Zásadní je v bachoru přítomnost bakterií, které se podílejí na štěpení celulózy a dalších rostlinných polysacharidů, mezi nejvýznamnější celulolytické bakterie patří *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens* (Koike and Kobayashi, 2001). Přičemž u některých jedinců skotu nemusí být *Fibrobacter succinogenes* obsažen vůbec (Jami et al., 2012). Důležitá je přítomnost prvoků, i přes jejich menší počet, ve srovnání s počtem bakterií, je jejich objem, v předžaludku zhruba shodný s objemem přítomných bakterií. Jedná se tedy o významný zdroj proteinů a aminokyselin pro přežvýkavce. Funkce protozoí spočívá především ve fermentaci rozpustných sacharidů a škrobu, ale i jiných polysacharidů, jako je například xylan (Krause et al., 2003). Hlavními produkty jejich metabolismu jsou kyselina octová, kyselina máselná, oxid uhličitý a vodík. Hlavní metabolity bakterií jsou kyselina octová, kyselina propionová a kyselina máselná. Mikroorganismy v bachoru tedy hydrolyzují a fermentují rostlinou potravu za vzniku těkavých mastných kyselin (SCFA) a následně se tyto kyseliny vstřebávají přes bachorovou stěnu do krve, kde slouží jako zdroj energie. Těkavé mastné kyseliny dodávají až 75 % potřebné energie pro přežvýkavce (Kristensen et al., 1998).

Přítomnost mikroorganismů v tenkém střevě je ovlivněna poměrně rychle proudící tráveninou, sekrecí žlučových kyselin a aktivitou imunitního systému. V tenkém střevě je poměrně vysoká sekrece imunoglobulinů, zvláště IgA, které zabraňují adhezi bakterií na střevní epitel (Tuohy and Del Rio, 2014). Kaudálním směrem se množství bakterií v trávicím traktu zvyšuje, v tenkém střevě jsou bakterie přítomné v počtu okolo 10^8 KTJ/g, v tlustém střevě až 10^{12} KTJ/g (Leser and Mølbak, 2009). V tlustém střevě u monogastrických zvířat převažují bakterie kmenů Firmicutes a Bacteroidetes. Ostatní kmeny jako Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Verrucomicrobia, Tenericutes a Cyanobacteria jsou v intestinálním traktu přítomny, ale jejich množství je většinou minoritní (Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013). Pokud jsou srovnávány studie, které se zabývají složením střevní mikrobioty u zvířat, někdy jsou prezentovány poměrně rozdílné výsledky. Důvody těchto rozdílných výsledků mohou být samozřejmě způsobeny odlišným složením střevní mikrobioty, ale na získané výsledky má i vliv zvolená metoda identifikace a charakterizace mikroorganismů a u molekulárně genetických metod má významný vliv způsob extrakce DNA (Garcia-Mazcorro and Minamoto, 2013; Kunin et al., 2010; Zoetendal et al., 2001).

2.1.2 Funkce střevní mikrobioty

Gastrointestinální trakt je ideálním místem pro růst a množení bakterií, které jsou přizpůsobené teplotě savců a anaerobním podmínkám. Jedná se o symbiózu mezi makro a mikroorganismy, která se vyvíjela více než miliardu let (Neish, 2002). Hlavní funkcí gastrointestinálního traktu je trávení a vstřebávání potravy a tomu napomáhají i přítomné bakterie. Kromě metabolických přeměn různých substrátů v trávicím traktu neboli nutriční funkce, má střevní mikrobiota i funkci imunologickou a fyziologickou.

Mikroorganismy přítomné v trávicím traktu získávají energii především z nestrávených sacharidů, které jsou přítomny v potravě. Kromě sacharidů jsou v tlustém střevě bakteriemi rozkládány i bílkoviny a peptidy. Kromě nestrávené potravy mohou mikroorganismy přítomné v trávicím traktu využít i látky, které nejsou dietního původu, jedná se například o mucin produkovaný buňkami střevního epitelu. Některé bakterie preferují mucin jako hlavní zdroj energie místo jiných sacharidů (Egert et al., 2006).

Při trávení určitých substrátů produkují bakterie zdravotně prospěšné bioaktivní metabolity, mezi které patří bioaktivní lipidy, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem a konjugovaná kyselina linolová. Nejvýznamnějšími SCFA jsou kyselina octová, propionová a máselná. Nejvyšší koncentrace SCFA se nachází v tlustém střevě, kde slouží jako zdroj energie pro enterocyty nebo jsou transportovány přes střevní epitel do krevního řečiště. Produkce SCFA příznivě ovlivňuje metabolismus glukózy a lipidů v játrech. Například bylo prokázáno, že kyselina propionová snižuje obsah mastných kyselin v játrech a v plazmě a pravděpodobně zvyšuje citlivost tkání na inzulin (Al-Lahham et al., 2010). Kyselina máselná zase slouží jako zdroj energie pro enterocyty a její nedostatek může způsobovat různé střevní záněty. Pokud se v tlustém střevě zvýší množství produkce metabolitů obsahující síru (například H_2S a methanliol), tyto metabolity začnou blokovat oxidaci butyrátu enterocyty, což může vést k epitelové atrofii (Egert et al., 2006). Acetát je využíván jako zdroj energie nebo jako prekurzor pro syntézu různých komplexních molekul v játrech, svalech a jiných periferních tkáních (Bindels et al., 2012). Navíc přítomnost SCFA snižuje pH v tlustém střevě, a tak vzniká nevhodné prostředí pro patogenní mikroorganismy (Cummings and Macfarlane, 1997). Řada bakterií v trávicím traktu produkuje vitamin K_2 a vitaminy skupiny B (thiamin B_1 , riboflavin B_2 , kobalamin B_{12} , kyselina listová B_9), které jsou využitelné pro hostitele (Conly and Stein, 1992). Kromě produkce vitaminů se střevní mikrobiota podílí i na

vstřebávání elektrolytů a vody a zlepšuje absorpci vápníku, hořčíku, zinku a železa v tlustém střevě (Cummings and Macfarlane, 1997; Scholz-Ahrens et al., 2001).

Střevní epitelální buňky jsou pokryty hlenem (mucus), který je tvořen především mucinem. Mucin je název pro skupinu glykoproteinů, které jsou produkovány pohárkovými buňkami. Střevní mukus funguje jako lubrikant a usnadňuje transport živin. Zároveň ale slouží jako obranná linie proti bakteriální invazi. Ve vnější části mukózní vrstvy jsou adherované bakterie, které jsou zde navázány díky přítomnému lektinu. Lektiny jsou proteiny neimunitního původu a jejich významnou vlastností je, že dokáží selektivně rozpoznávat a následně vázat cukry, glykoproteiny a glykolipidy přítomné v buněčné stěně bakterií. Proto zde mohou být navázány jen určité druhy bakterií, pro které může být mucin i zdrojem energie, jak už bylo výše popsáno. Ve studiích porovnávajících bezmikrobní a konvenční zvířata bylo zjištěno, že přítomnost bakterií pozitivně ovlivňuje morfologii střeva. Bylo zjištěno, že u konvenčních zvířat je mukózní vrstva silnější a množství pohárkových buněk je vyšší než u bezmikrobních zvířat (Sharma et al., 1995). Přítomnost mikroorganismů ovlivňuje i morfologii samotného střevního epitelu. Bylo například zjištěno, že epitelové buňky ve střevech bezmikrobních zvířat mají méně vyvinuté mikrokly (Banasaz et al., 2002). Další práci týkající se rozdílů v histologii tlustého střeva konvenčních a bezmikrobních zvířat publikovali Wikoff et al. (2009). Autoři uvádí, že bezmikrobní myši mají vyšší počet serotonin produkujících buněk (enterochromafinní buňky) ve srovnání s konvenčními myšmi, zajímavé ale je, že množství serotoninu bylo vyšší u konvenčních myší. Serotonin patří mezi významné neurotransmitery, které ovlivňují mimo jiné i funkci gastrointestinálního traktu a proto se předpokládá, že nižší množství serotoninu negativně ovlivňuje střevní peristaltiku a prodlužuje dobu trávení (Samuel et al., 2008). Střevní mikrobiota se také podílí na proliferaci střevních buněk. Jones et al. (2013) ve své studii uvádí, že laktobacily stimulují produkci oxidas, které jsou zodpovědné za proliferaci enterocytů. Přítomnost bakterií také například podněcuje růst Peyerových plástů, které jsou součástí slizniční imunity (Lu and Walker, 2001). Zajímavý je také poznatek nedávné studie, kde Reinhardt et al. (2012) popisují, že střevní mikrobiota ovlivňuje vývoj vaskulárního systému. Kolonizace bezmikrobních myší bakteriemi způsobuje restrukturalizaci střevních klků, které se zkrátí a rozšíří, díky tomu se zabrání mikrobiální infiltraci. Změna morfologie střev způsobí vyšší potřebu kyslíku endotelových buněk a v důsledku toho probíhá i intenzivnější angiogeneze.

Střevní mikrobiota gastrointestinálního traktu je důležitá pro vývoj imunitního systému a stimuluje jak fyziologický vývoj humorální, tak buněčné slizniční imunity. Většina imunitních buněk je lokalizována pod slizničním povrchem, kde tvoří slizniční lymfatický systém. Aby se imunitní systém mohl správně vyvíjet, potřebuje se dostat do kontaktu s bakteriálními antigeny a k tomu využívá antigen prezentující buňky (makrofágy, dendritické buňky, B-lymfocyty). Při optimálním složení střevní mikrobioty dochází k imunitní reakci, která vede k produkci cytokinů a vzniku aktivní tolerance neškodných antigenů. Tyto antigeny jsou velice důležité pro vývoj vyváženého typu imunitní odpovědi. Pokud nedochází k dostatečné stimulaci imunitního systému, převažuje typ Th2 imunitní odpovědi, což vede k přehnaným imunitním reakcím. Th2 buňky podporují vznik imunoglobulinů E, které jsou zodpovědné za alergické reakce (Umetsu et al., 2002). Konkrétním příkladem modulace imunitního systému přítomností mikroorganismů v trávicím traktu může být bakteriální polysacharid produkovaný *Bacteroides fragilis*, který řídí buněčné zrání vyvíjejícího imunitního systému tím, že podporuje vývoj lymfocytů typu Th1 a tím napomáhá k rovnováze imunitní odpovědi (Mazmanian et al., 2005). Kromě modulace imunitní odpovědi střevní bakterie ochraňují hostitele i vytvářením určité ochranné bariéry. Komezální bakterie obsazují vazebná místa na střevním epitelu a tak přítomné patogeny nemohou proniknout přes slizniční povrch do těla hostitele a zahájit svůj životní cyklus. Zároveň dochází ke kompetici o zdroj živin, vitaminů a růstových faktorů, které jsou nezbytné pro růst a rozmnožování bakterií (Lee and Salminen, 2009).

V posledních letech jsou také k dispozici studie popisující interakce mezi střevním mikrobiomem a centrální nervovou soustavou. Bakterie přítomné ve střevě hostitele syntetizují širokou škálu kompletních signálních molekul nebo molekul, které jsou za ně zaměnitelné a tím působí na neurony enterického nervového systému nebo na bloudivý nerv. Konkrétně se jedná například o serotonin, γ -aminomáselná kyselina, katecholaminy a acetylcholin (Patterson et al., 2014).

2.2 Střevní mikrobiota mláďat přežvýkavců

O složení střevní mikrobioty trávicího traktu mláďat přežvýkavců není k dispozici mnoho studií. Většina studií se zabývá vývojem a složením mikrobioty bachoru, které má vliv na následné produkční vlastnosti dospělého jedince. Vyvážené složení střevní mikrobioty ale není o nic méně důležité, protože může ovlivnit zdravotní stav zvířete. Pokud mláďata přežvýkavců trpí střevními infekcemi, jejich vývoj může být zpomalen a může mít negativní efekt na produktivitu zvířete (Signorini et al., 2012). Infekční průjmová onemocnění jsou navíc jednou z hlavních příčin ekonomických ztrát v důsledku mortality. Mellado et al. (2014) uvádějí, že úmrtnost telat v prvních 16 týdnech života se obvykle pohybuje mezi 8 a 12 %, toto rozmezí hodnot platí pro mírné klimatické podmínky a liší se mezi stády. Střevní infekce u mláďat hospodářských zvířat jsou nejčastěji způsobeny *Escherichia coli*, rotaviry, koronaviry, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp. a *Cryptosporidium* sp. Salmonelóza je považována za jednu z nejvýznamnějších zoonóz s velkými ekonomickými dopady. I když u dospělého skotu salmonely častěji způsobují subklinické infekce (bez klinických příznaků onemocnění), u telat mohou ve stádě vyvolat průjmové onemocnění s vysokým úhynem (Rana et al., 2012). Podobně je to i s bakteriemi *E. coli*, které jsou běžnou součástí střevní mikrobioty mláďat přežvýkavců, ale některé patogenní kmeny *E. coli* mohou způsobovat vážná průjmová onemocnění (Walle et al., 2013). Na druhou stranu některé kmeny *E. coli* mohou snižovat možnost střevní infekce u mláďat přežvýkavců podobně jako probiotický kmen *E. coli* Nissle 1917 u lidí (von Buenau et al., 2005).

2.2.1 Složení a vývoj střevní mikrobioty mláďat přežvýkavců

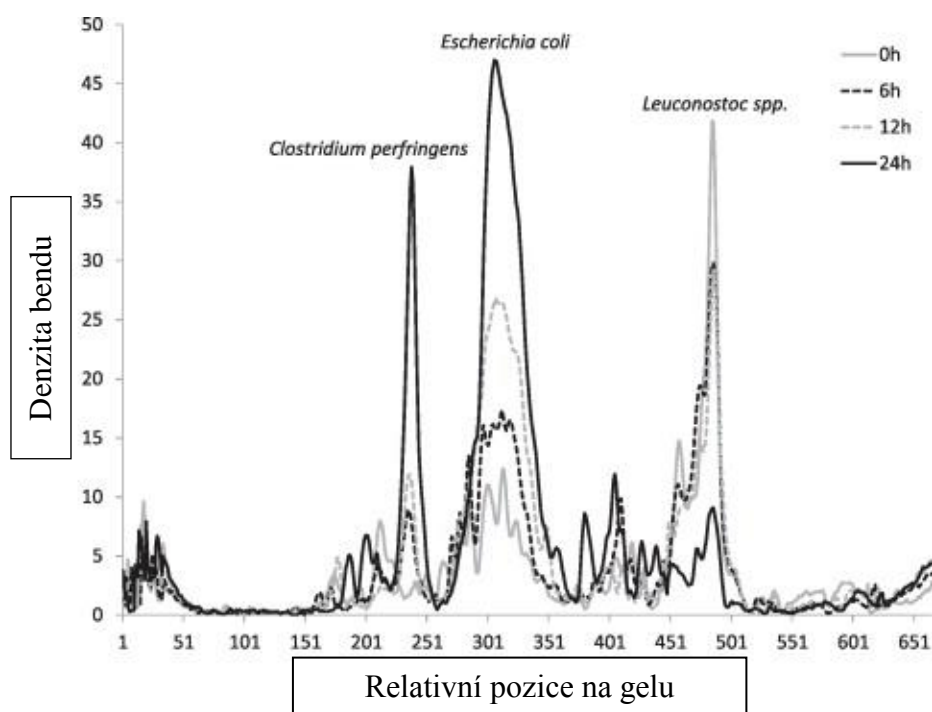
Mezi dominantní bakteriální kmeny, které jsou přítomné v trávicím traktu telat, patří Bacteroidetes, Proteobacteria a Firmicutes. Dvanáct hodin po porodu jsou v intestinálním traktu přítomné bakterie patřící především do kmene Proteobacteria. Po několika dnech se ale bakteriální zastoupení změní a dominantní skupinou se většinou stávají bakterie, které patří do kmene Bacteroidetes. Tyto bakterie tvoří průměrně 69,3 % celkové střevní mikrobioty telat, ale jejich počet se mění v závislosti na stáří telete a dalších vlivech jako je například dieta a tak se počet těchto bakterií pohybuje v rozmezí od 31,7 – 84,8 % (Klein-Jobstl et al.,

2014). U dospělých jedinců je pak dominantním kmenem v trávicím traktu skotu kmen Firmicutes (Kim et al., 2014).

Mayer et al. (2012) publikovali studii, kde sledovali raný vývoj střevní mikrobioty u mláďat telat pomocí PCR-SSCP metody (Polymerase Chain Reaction – Single-strand conformation polymorphism; obrázek č. 2). Mezi prvními detekovatelnými bakteriemi po narození byly fakultativně anaerobní bakterie rodu *Citrobacter* a bakterie mléčného kvašení jako jsou *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus*. Autor zároveň uvádí, že *Citrobacter* sp., bakterie patřící k čeledi *Enterobacteriaceae*, vymizely z trávicího traktu telat do 24 hodin. Podobně na tom byl i rod *Leuconostoc*. Po prvním dnu života se staly dominantní skupinou *E. coli*, ale jejich počty se po třech až sedmi dnech snižovaly nebo tyto bakterie úplně vymizely. Uvedené výsledky jsou ve shodě se studii, kde bylo pomocí kultivační metody zjištěno, že třetí den života byly u telat a jehňat v trávicím traktu dominantní skupinou laktobacily a koliformní bakterie, mezi které patří i *E. coli* (Vlková et al., 2006; Vlková et al., 2009). Střevní mikrobiota telat se přibližně do sedmi dnů relativně ustálí a početnými se stávají bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie (Maldonado et al., 2012; Mayer et al., 2012; Ventura et al., 2004). Podle Rada et al. (2006) je střevní mikrobiota telat na mléčné výživě podobná mikrobiotě kojenců s převahou bifidobakterií, kde počty bifidobakterií převyšovaly počty laktobacilů o dva řády. Stejně jako mateřské mléko i kravské mléko obsahuje určité množství oligosacharidů (0,7 – 1,2 g/l), které má bifidogenní efekt, to znamená, že podporují růst bifidobakterií v trávicím traktu (Bondue and Delcenserie, 2015). Přítomnost oligosacharidů kravského mléka (BMO – bovine milk oligosaccharides) může být jedním z důvodů, proč dieta významně ovlivňuje výskyt bifidobakterií v trávicím traktu telat. Telata na mléčné výživě mají vyšší počet bifidobakterií než telata na kombinované dietě. Telata, která nesají mléko od svých matek a přijímají mléčné krmné směsi v kombinaci se startérem, mají počty bifidobakterií podobně vysoké jako počty laktobacilů (Vlková et al., 2008). Mezi druhy bifidobakterií, které se vyskytují u mláďat telat patří *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis* a *longum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. thermophilum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* (Biavati et al., 2000; Bunešová et al., 2012a). Mezi laktobacily, které se vyskytují u telat v intestinálním traktu, patří *Lactobacillus johnsonii*, *L. salivarius*, *L. murinus*, *L. mucosae*, a *L. amylovorus* (Maldonado et al., 2012). Počet laktobacilů stejně jako množství *Faecalibacterium* sp. klesá v období, kdy jsou telata odstavována. Naopak při odstavu telat se

zvyšují počty bakterií rodu *Paraprevotella*, *Oscillibacter*, *Alistipes* a *Phocaeicola* (Klein-Jobstl et al., 2014). Výskyt těchto bakterií je spojován s vyšším příjmem vlákniny (Rice et al., 2012). Další bakterie, které jsou běžnou součástí střevní mikrobioty telat, jsou bakterie patřící do rodu *Bacteroides*, *Sutterella*, *Rikenella*, *Butyricoccus*, *Parabacteroides*, *Clostridium* a koliformní bakterie (Klein-Jobstl et al., 2014).

Obrázek č. 2: Porovnání denzitometrických křivek získaných pomocí PCR-SSCP u 14 telat v časech 0 h, 6 h, 12 h a 24 h po narození (Mayer et al., 2012).



2.2.2 Odchov a výživa telat

Z hlediska výživy se chov mláďat přežvýkavců rozděluje na mlezivové, mléčné a rostlinné období. Tato období jsou zásadní pro následnou užitkovost dospělého jedince. Cílem odchovu je odchovat mláďata do dospělého věku s co možná nejnižšími náklady, nejvyššími

přírůstky a nejnižším úhynem. U mléčného skotu se klade důraz na rychlé zahájení příjmu pevného krmiva a na cílenou přípravu bachorové fermentace. V současné době se extenzivní odchov uplatňuje častěji u masných plemen skotu, zatímco intenzivní odchov je běžný u mléčného skotu. U extenzivního chovu jsou mláďata po boku své matky, sají mateřské mléko a postupně přirozeně přecházejí na rostlinnou stravu. Produkce mléka krav v extenzivním odchovu je relativně nízká a pokrývá pouze potřeby mláďete. Zvířata jsou téměř po celý rok na pastvě a jen v zimních měsících jsou ustájena ve stájích nebo ve speciálních přístřešcích. Naopak u intenzivního chovu jsou mláďata přežvýkavců brzy odebírána od svých matek a umístována do individuálních boxů. Vazba mezi matkou a potomkem je násilně porušena a to vede ke zvýšenému stresu u telete a k horší adaptaci na nové podmínky (Albright and Arave, 1997). Navíc telata v intenzivních chovech nejsou napájena mlékem přímo od matky, ale jsou většinou krmena mléčnými krmnými směsmi, které se složením nevyrovnají plnotučnému mléku. Všeobecně se jedná o chov, kde koncentrace zvířat na jednotku plochy je v porovnání s extenzivním chovem vyšší, z čehož vyplývají různá rizika, především v podobě infekčních onemocnění (Phillips, 2002).

2.2.2.1 Mlezivové období

Telata se rodí jako hypogamaglobulinemická, to znamená, že mají v krvi velmi malé množství protilátek. Proto je důležité, aby se mláďe po porodu dostatečně napilo mleziva, které obsahuje důležité živiny, nespecifické imunitní faktory, antibakteriální faktory a imunoglobuliny (zejména imunoglobuliny G₁), které chrání novorozené tele (Christiansen et al., 2010). Přijaté protilátky se dostanou skrz sliznici tenkého střeva do krevního řečiště, kde pak plní svou ochrannou funkci. Minimální množství mleziva, které musí tele přijmout je dáno směrnicí Rady Evropské unie 2008/119/ES. V této směrnici je uvedeno, že tele musí být nejpozději do šesti hodin po porodu napojeno mlezivem a to v množství kolem 6 % váhy telete, což odpovídá přibližně 2 – 2,5 l mleziva. Množství imunologicky aktivních látek se v mlezivu s časem snižuje a to je jedním z důvodů, proč je důležité napojit mláďata přežvýkavců co nejdříve. Dalším důvodem, proč na první napojení pospíchat, je absence trávicích enzymů a kyseliny chlorovodíkové ve slezu v několika hodinách po porodu. Ty se začínají tvořit později po narození. Proto je vhodné napojit mláďe co nejdříve, aby

nedocházelo ke zbytečné denaturaci imunoglobulinů a jiných protektivních bílkovin obsažených v mlezivu (Nagalakshmi, 2009).

Fyziologický způsob příjmu mleziva je sání z vemene, ale v některých případech nemusí dojít k dostatečnému příjmu mleziva a tak tele může být napojeno pomocí lahve. Napájení pomocí lahve může být použito u masného skotu, kdy kráva není ochotná kojit tele nebo má nevhodně tvarovaná vemena a struky. Ve velkochovech mléčného skotu se dává automaticky přednost řízenému napájení telat pomocí lahve nebo jícnové sondy. Výhodou je přehled o množství přijatého mleziva. Mlezivové období trvá od narození telete přibližně prvních sedm dní života mláděte (Phillips, 2002).

2.2.2.2 Mléčné období

Po mlezivovém období přecházejí telata do období mléčné výživy, které trvá přibližně 3 měsíce. Z hlediska příjmu potravy je trávení mláďat přežvýkavců podobné mláďatům nepřežvýkavých zvířat a k tomu je uzpůsobená i jejich fyziologie. Po narození telete dochází především k rozvoji vlastního žaludku, ale zvětšuje se i objem předžaludku. Slez během prvního týdne zdvojnásobí svoji váhu, zatímco bachor dosahuje jen ¼ objemu slezu. Přibližně 8. týden se velikosti vyrovnají a v období přechodu na rostlinou stravu je bachor již větší než slez. Během mléčného období bachor neplní svoji fermentační funkci a neprobíhají zde ani žádné peristaltické pohyby. Přijímané mléko ani neprochází předžaludkem. Pomocí jícnového a čepcobachorového splavu natéká až 97 % mléka přímo do slezu (Nagalakshmi, 2009). Mléko a mléčné krmné směsi jsou tráveny ve slezu a v tenkém střevě. Předpokladem pro optimální trávení je hlavně kvalitní bílkovina, která je trávena za pomoci enzymů a za spolupůsobení kyseliny chlorovodíkové. Ve slezu tak dochází ke srážení mléka chymosinem a následně k jeho trávení. Při poruše trávení či srážení mléka je vhodné zkrmované mléko nebo mléčnou krmnou směs okyselovat. Okyselení může do jisté míry nahradit žaludeční šťávy a tím usnadnit trávení potravy (Bayram et al., 2007). Metin et al. (2006) testovali efekt příjmu okyseleného a neokyseleného mléka na váhový přírůstek a celkové zdraví zvířete. Zjistili, že mezi testovanými skupinami nebyl rozdíl, co se týče váhového přírůstku, ale skupina telat, která přijímala okyselené mléko, měla nižší výskyt průjmů.

Kromě mléka nebo mléčných krmných směsí mají telata k dispozici také vodu a to ad libitně. Zároveň je součástí krmné dávky startér složený ze směsi zrnin, která podporuje

tvorbu bachorových papil. Díky tomu se zvětšuje aktivní povrch bachorové sliznice potřebné ke vstřebávání živin z přijaté potravy. Startér lze podávat již od třetího dne věku telete a je podáván ad libitně. Spotřeba startéru se s věkem zvyšuje a při příjmu nad 1 kg/den může být do krmné dávky zahrnuto i objemné krmivo. V extenzivních chovech se startér mláďatům nepodává. Pokud jsou telata ustájena se svými matkami nebo jsou s matkami na pastvě, k příjmu objemných krmiv dochází dřív. To ale může mít za následek nedostatečné rozvinutí bachorových papil. V každém případě je důležité, aby si telata navykala jak na krmiva jadrná, tak i na krmiva objemná (Phillips, 2002).

2.2.3 Rozdíl ve výživě telat v extenzivním a intenzivním chovu

Sání mléka od matky se uplatňuje především u telat z extenzivních chovů, kde kravské mléko neslouží k tržní produkci. Jiné systémy odchovu a výživy zde bývají neefektivní. Při sání mléka jsou splněny veškeré fyziologické potřeby telete. A stejně jako u mleziva, je sání mateřského mléka od vlastní matky nejpřirozenější způsob výživy. Kravské mléko je optimálním zdrojem živin pro mláďata telat, protože má vysokou nutriční hodnotu, je dobře stravitelné a obsahuje různé hormony a růstové faktory (Vasseur et al., 2010). Navíc podle Godden et al. (2005) je u telat na mléčné výživě nižší úmrtnost ve srovnání s telaty, která jsou krmena mléčnými náhražkami. Další výhodou je samotný proces sání, který má prokazatelný vliv na snížení stresu u telat a to má pozitivní efekt na posílení obranyschopnosti. Zároveň se předpokládá, že umožnění krávám kojit svoje vlastní tele snižuje i jejich stres (Johnsen et al., 2015).

V intenzivních chovech skotu je mléko tržním produktem a telata jsou krmena buď mléčnými krmnými směsí, nebo mlékem, které není vhodné pro prodej. Mlékem, které není vhodné pro tržní produkci, je myšleno mléko od starodojných krav nebo krav trpící mastitidou nebo mléko nezralé. Mléko od nemocných krav je často kontaminováno antibiotiky nebo patogenními mikroorganismy. Krměním telat neošetřeným mlékem od krávy, která trpí mastitidou, může být u telat v důsledku přenosu infekčních patogenů vyvolána různá onemocnění (Godden et al., 2005). Netržní mléko by se mělo před jeho zkrmováním ošetřit buď okyselením, nebo šetrně zahřát. Zvolením nevhodné teploty ale může dojít k denuraci některých bílkovin a tím ke zhoršení stravitelnosti mléka. V některých intenzivních chovech se může uplatňovat napájení od kojné krávy, která může uživit až 3 telata najednou. Většinou

se jedná o krávy se závadou na vemeni, která znemožňuje strojové dojení. Nejčastějším způsobem výkrmu telat v intenzivních chovech je podávání mléčných krmných směsí. Tyto směsi se používají hlavně z ekonomických důvodů, protože snižují náklady na odchov skotu. Výhodou mléčné krmné směsi je, že neobsahuje žádné nežádoucí mikroorganismy a může být namíchan přesný objem nápoje, který je jednoduše připravenelný. Při výběru mléčných nápojů pro telata je nejdůležitější jejich kvalita, protože musí kompletně pokrýt výživovou potřebu telete. Mléčné krmné směsi jsou většinou složené z odstředěného mléka, sušené syrovátky a z tuku s přísávkem emulgátoru a antioxidantů, často bývají součástí i vitamíny a minerální látky. Složení a množství jednotlivých nutrientů záleží vždy na výrobcu. Přesto, že mléčná bílkovina je z hlediska výživy mláďat nevhodnější, často se používají bílkoviny rostlinného původu (sójoproteinové koncentráty nebo hydrolyzáty pšeničného proteinu), kvůli kterým je výsledná stravitelnost mléčné krmné směsi pro telata horší. Dalším negativem mléčných nápojů je absence růstových faktorů a hormonů, proto se ještě v nedávné době přidávaly do mléčných krmných směsí antibiotika, jako stimulatory růstu. Tento druh antibiotik je ale v současné době v Evropské unii zakázán, protože velkoplošné používání antibiotik u hospodářských zvířat vedlo ke vzniku antibiotické rezistence některých patogenů a zároveň byla nalézána rezidua antibiotik v produktech živočišného původu (Abu-Tarboush et al., 1996).

2.3 Probiotika

Poznatek, že střevní mikrobiota se úzce podílí na zdraví hostitele, vedlo k myšlence, že by se s ní mohlo manipulovat ku prospěchu hostitele. Jednou z možností jak pozitivně ovlivnit zdraví jedince přes střevní mikrobiotu je podávání probiotik. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos (FAO/WHO, 2013). Pomocí probiotik lze dosáhnout navrácení nebo udržení správné a přirozené střevní mikrobioty (Hill et al., 2014).

Podle platné legislativy Evropské Unie se probiotika určená pro zvířata řadí mezi krmná aditiva a jejich používání se řídí směrnicí Rady Evropské unie 70/524/EEC, která spadá pod nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 o aditivech určených pro výživu zvířat. Na základně nařízení Komise musí být od roku 2000 každý mikrobiální kmen určený pro zvíře posouzen a schválen orgány EU dříve, než vyjde na trh (von Wright, 2005). Pokud je zaváděn nový probiotický kmen, musí být doložen pozitivní efekt na konkrétní kategorii zvířat. Dále musí být důkladně posouzena rizika spojená s konzumací daného kmene, to znamená, že probiotický kmen nesmí mít negativní vliv na cílového hostitele ani na životní prostředí. Mezi takové testy patří produkce toxinů, přítomnost faktorů virulence a rezistence vůči antibiotikům (Becquet, 2003).

Je důležité, aby příslušné regulační orgány pečlivě sledovaly a kontrolovaly probiotické výrobky určené pro zvířata, protože některé studie dokazují, že deklarované bakteriální kmeny na etiketách výrobků buď chybí, nebo jsou přítomny jiné druhy. Navíc u některých druhů mikroorganismů se používají komerční názvy, které jsou rozdílné od názvů bakterií v taxonomických systémech, a i z tohoto důvodu může docházet k chybnému určení totožnosti probiotického kmene (Wannaprasat et al., 2009).

2.3.1 Vlastnosti probiotických bakterií

Při hledání nových probiotických mikroorganismů je důležité si uvědomit, že některé probiotické vlastnosti se nevztahují na druh bakterie nebo na celý bakteriální rod, ale jsou kmenově specifické. Mezi běžné pozitivní účinky probiotických bakterií lze řadit produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, regulaci střevního tranzitu, konkurenční vyloučení patogenů a ustálení narušené mikrobioty. Mezi druhově specifické vlastnosti probiotických bakterií patří například syntéza vitaminů, posílení střevní bariéry, přímý antagonismus a

enzymatická aktivita. Mezi vzácně se vyskytující kmenově-specifické účinky se řadí produkce specifických bioaktivních látek, endokrinnologické, imunologické a neurologické účinky (Hill et al., 2014) viz tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Možné rozšíření mechanismů probiotického účinku mezi probiotickými kmeny bakterií (Hill et al., 2014).

Běžné účinky probiotických bakterií
<ul style="list-style-type: none">• Tvorba SCFA• Regulace střevního tranzitu• Ustálení narušené střevní mikrobioty• Konkurenční vyloučení patogenních mikroorganismů
Druhově specifické účinky
<ul style="list-style-type: none">• Syntéza vitaminů• Přímý antagonismus proti patogenním nebo podmíněně patogenním mikroorganismům• Posílení střevní bariéry• Hydrolýza nebo dehydrogenace žlučových kyselin• Enzymatická aktivita• Neutralizace karcinogenních látek
Kmenově-specifické účinky
<ul style="list-style-type: none">• Neurologické účinky• Imunologicko-stimulační účinky• Endokrinnologické účinky• Produkce specifických bioaktivních molekul

Pokud je izolován nový bakteriální kmen, musí splňovat bezpečnostní kritéria a být otestován na různé probiotické vlastnosti, které jsou uvedeny v tabulce č. 2. Vlastnosti potenciálně probiotických kmenů jsou zjišťovány pomocí *in vitro* a *in vivo* testů. První analýzy jsou zaměřené na fyziologické vlastnosti, kam patří například tolerance vůči žluči, ke

kyselému prostředí a schopnost adherovat na střevní epitel. Druhým okruhem testů se zjišťují technologické vlastnosti probiotických bakterií, kam patří například životaschopnost probiotik během procesu výroby, stabilita v produktu během skladování a rezistence vůči fágům. Pravděpodobně žádný bakteriální kmen nebude splňovat všechny probiotické vlastnosti, ale je vhodné, aby jich splňoval co nejvíce (Vlková et al., 2009). Vhodné je i zařazení *in vivo* testů, kdy lze prokázat, jak podaná bakterie snáší průchod trávicím traktem, či zda jsou schopny střevo trvale kolonizovat (Vlková et al., 2010). Detekce testovaných bakteriálních kmenů může být provedena ve fekálních vzorcích buď fingerprintovou metodou, jako je například pulzní gelová elektroforéza, sekvenací genů pro 16S rRNA a HSP60, hmotnostní spektrometrií MALDI TOF nebo mohou být testované kmeny odlišeny pomocí vytvoření mutantů rezistentních k antibiotiku, ke kterému jsou běžně citlivé. Podané kmeny se pak detekují pomocí kultivace na médiu obsahujícím příslušné antibiotikum. Příkladem může být vytvoření rifampicin rezistentních mutantů bifidobakterií (Rada et al., 1995).

Tabulka č. 2: Bezpečnostní kritéria a vlastnosti probiotik (Gaggia et al., 2010).

-
- ✓ Netoxické a nepatogenní
 - ✓ Přesná taxonomická charakterizace a identifikace
 - ✓ Mikroorganismus přirozeně se vyskytující u cílového hostitele
 - ✓ Přežívání, kolonizace a metabolická aktivita v trávicím traktu hostitele, což zahrnuje:
 - ✓ Odolnost vůči kyselému prostředí, žlučovým kyselinám a žaludečním šťávám
 - ✓ Perzistence v trávicím traktu
 - ✓ Schopnost adherovat na střevní epitel
 - ✓ Kompetice s autochtonní mikrobiotou
 - ✓ Produkce antimikrobiálních látek
 - ✓ Antagonismus vůči patogenním mikroorganismům
 - ✓ Modulace imunitní odpovědi
 - ✓ Genetická stabilita
 - ✓ Pozitivní ovlivnění zdraví hostitele, které by mělo být podpořeno vědeckými studiemi
 - ✓ Stabilita kmene během procesu zpracování, skladování a aplikace
 - ✓ Životaschopnost ve vysokých počtech
 - ✓ Žádoucí organoleptické a technologické vlastnosti
-

2.3.2 Probiotika ve výživě zvířat

Mezi mikroorganismy, které se nejběžněji používají v zemích Evropské unie jako probiotika pro hospodářská zvířata patří především grampozitivní bakterie rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* a kvasinky rodu *Saccharomyces*. Kompletní seznam používaných probiotických druhů je uveden v tabulce č. 3 (Gaggia et al., 2010). Některé bakteriální druhy se používají jak pro lidskou spotřebu, tak i pro zvířata. Ale je vhodné si uvědomit, že probiotika v lidské výživě se používají převážně z důvodu dlouhodobého efektu pro podporu zdraví. Naopak v živočišné výrobě se od probiotik očekávají poměrně rychlé účinky, jako jsou zvýšení tělesné hmotnosti, zlepšení konverze krmiva a snížení výskytu infekčních onemocnění trávicího traktu. Proto výsledky výzkumů zabývající se účinky probiotik na lidi nejsou plně srovnatelné s probiotickým efektem u hospodářských zvířat (Million et al., 2012).

Co se týká výběru vhodného kmene, obecně se uvádí, že aktivita probiotických mikroorganismů je často druhově specifická a často se liší i v rámci jednoho druhu (Gardiner et al., 2004). Pro zvýšení pravděpodobnosti kolonizace je doporučeno, použít kmen původně izolovaný z trávicího traktu druhu zvířete, pro který jsou daná probiotika určena. Možné je také volit mezi probiotickými preparáty jednodmenovými a vícekmennými s tím, že z různých vědeckých studií vyplývá, že použití více kmenů v jednom výrobku je efektivnější a to díky synergickému působení jednotlivých bakterií (Timmerman et al., 2004). Mezi další faktory, které mohou ovlivnit efekt účinku probiotik, patří množství bakterií, načasování a celková doba, po kterou jsou probiotika podávána. Například Sazawal et al. (2006) ve své studii uvádí, že vyšší dávka probiotik výrazněji zkracuje trvání akutního infekčního průjmu než podání probiotik v menším množství. Co se týče věku zvířete a aplikace probiotik, výraznější účinek je u mláďat zvířat. Novorozená zvířata mají rozvíjející střevní mikrobiotu, a proto je u nich vyšší pravděpodobnost trvalé kolonizace probiotickými bakteriemi. Zároveň je vhodné zahrnout probiotika do krmné dávky ve stresujících obdobích jako je doba odstavu, začátek laktace nebo změna složení krmné dávky (Gaggia et al., 2010).

Probiotika pro zvířata mohou být aplikována samostatně nebo společně s krmivem nebo s vodou. Společné podávání krmiva s probiotikem ale nese určité riziko možné interakce probiotických bakterií s komponenty krmiva. Vlastní způsob aplikace probiotik bývá nejčastěji ve formě lyofilizovaného prášku, ale k dostání jsou například i probiotika ve formě past (Carvalho et al., 2004).

Tabulka č. 3: Seznam probiotický druhů určených pro zvířata jako krmná aditiva (Gaggia et al., 2010). V závorce jsou uvedeny názvy druhů, která jsou využívány při komerčním použití.

Rod	Druh
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> (<i>B. animalis</i>)
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (<i>B. lactis</i>)
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> (<i>B. longum</i>)
	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> (<i>B. pseudolongum</i>)
	<i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)
	<i>E. faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. amylovorus</i>
	<i>L. brevis</i>
	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> (<i>L. casei</i>)
	<i>L. crispatus</i>
	<i>L. farmicinis</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. murinus</i>
	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> (<i>L. plantarum</i>)
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. salivarius</i>	
<i>L. amylovorus</i> (<i>L. sobrius</i>)	
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (<i>Streptococcus cremoris</i>)
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i>
	<i>L. lactis</i>
	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
	<i>P. pentosaceus</i> subsp. <i>pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. infantarius</i>
	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
	<i>S. thermophilus</i> (<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>)
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> (<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i>)
	<i>B. licheniformis</i>
	<i>B. subtilis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)
	<i>S. pastorianus</i> (<i>S. carlsbergensis</i>)
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. fragilis</i>
	<i>K. marxianus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. oryzae</i>
	<i>A. niger</i>

Jak už bylo výše zmíněno, mezi běžně používané probiotické bakterie patří laktobacily. Jedná se o poměrně heterogenní skupinu zahrnující více než 100 druhů bakterií. Mnoho z nich je přirozenou součástí střevní mikrobioty lidí a zvířat. Laktobacily patří mezi bakterie mléčného kvašení a některé druhy jsou používány pro výrobu potravin nebo krmiv, zároveň jsou používány jako probiotika u lidí i zvířat (Hammes and Hertel, 2007). Vzhledem k dlouholeté historii bezpečného používání laktobacilů a žádného zdokumentovaného případu onemocnění způsobené laktobacily u zvířat, jsou laktobacily vhodným probiotickým rodem (Gaggia et al., 2010).

Bakterie rodu *Enterococcus* stejně jako laktobacily patří mezi bakterie mléčného kvašení a používají se jako startovací kultury v potravinářských produktech při výrobě sýrů, dále se používají jako probiotika a jako silážní přísady (Foulquié Moreno et al., 2006). Některé druhy jsou běžnou součástí střevní mikrobioty lidí a zvířat, nejčastěji se jedná o *E. faecium* a *E. faecalis* (Fisher and Phillips, 2009). Na druhou stranu enterokoky jsou někdy spojovány s lidskými infekcemi, nejčastěji jako nozokomiální infekce. U některých druhů byly popsány virulentní faktory a zvyšuje se počet vankomycin rezistentních enterokoků (Leavis et al., 2006). I když je s některými probiotickými kmeny enterokoků dobrá a dlouholetá zkušenost, jejich používání je v současné době sporné, kvůli častějším případům infekcí způsobené enterokoky a zvyšující se antibiotické rezistenci. Jsou zde obavy, že by geny zodpovědné za rezistenci vůči antibiotikům a geny kódující faktory virulence mohly být přeneseny na jiné bakteriální druhy (Foulquié Moreno et al., 2006).

Rod *Bacillus* je vysoce heterogenní skupina bakterií a zahrnuje druhy, které mohou způsobovat vážná onemocnění jako je například antrax a zároveň sem patří významní producenti antibiotik. V současné době se bacily používají v potravinářství, v krmivářství a některé druhy jsou používány jako probiotika pro lidi a zvířata. Výhodou probiotických bakterií rodu *Bacillus* je, že tvoří spory a tak mají oproti nesporulujícím probiotickým bakteriím několik výhod. Spory bacilů přežijí v potravinách a v krmivech, které při výrobě vyžadují vyšší tlak nebo teplotu, zůstanou životaschopné při dlouhodobém skladování potravin jak při pokojové teplotě, tak v chladírenských teplotách. Další výhodou je, že spory jsou rezistentní ke kyselému prostředí žaludku a žlučovým kyselinám (Nithya and Halami, 2013).

2.3.3 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou běžnou součástí střevní mikrobioty lidí a zvířat, obzvláště pak u kojených dětí bývají dominantní skupinou. Bifidobakterie jsou považovány za jeden z klíčových rodů bakterií v trávicím traktu, protože jejich přítomnost je spojována s dobrým zdravotním stavem hostitele (Rada et al., 2006). Bifidobakterie pomáhají udržovat rovnováhu gastrointestinálního traktu tím, že snižují možnost bakteriální infekce. Inhibici různých patogenů bifidobakteriemi dokazují mnohé studie (Dicks and Botes, 2010; Servin, 2004).

V současné době se bifidobakterie běžně používají jako probiotika pro lidskou výživu v produktech, jako jsou jogurty, sýry a jiné mléčné výrobky, kojenecká výživa a potravinové doplňky. Využití bifidobakterií ve výživě hospodářských zvířat je zatím minimální, i přesto že se zdají být jako vhodným probiotikem zvláště pro mláďata přežvýkavců, protože bifidobakterie jsou běžnou součástí jejich zdravé střevní mikrobioty. Lze tedy u nich očekávat stejný pozitivní efekt na zdravotní stav hostitele jako je tomu u lidí (Vlková et al., 2006). Druhy vyskytující se u mláďat přežvýkavců jsou uvedeny v kapitole 2.2.1. Střevní mikrobiota mláďat přežvýkavců.

2.3.3.1 Charakteristika a kultivační podmínky

Bifidobakterie patří do kmene Actinobacteria, kam se řadí bakterie s vysokým podílem G+C (> 55 %) v DNA (Lee and O'Sullivan, 2010). V současnosti je tento rod tvořen 58 druhy a 10 poddruhy (bacterio.net, 2017), a jak už bylo výše zmíněno, tyto bakterie jsou přirozenou součástí střevní mikrobioty lidí a některých teplokrevných zvířat (Bottacini et al., 2014). Bifidobakterie byly také nalezeny v trávicím traktu čmeláků a včel (Killer et al., 2009). Kromě gastrointestinálního traktu mohou být součástí vaginální mikrobioty nebo zubního plaku (Ventura et al., 2007). Bifidobakterie jsou charakterizovány jako nepravidelné, nesporulující, grampozitivní tyčinky, které jsou striktně anaerobní. Typické je pro ně tvarování do tvaru písmene Y nebo V a uspořádány mohou být buď jednotlivě, v řetězcích nebo tvoří různé shluky (Leahy et al., 2005). Nejvíce lidských druhů bifidobakterií roste v optimální teplotě 36 - 38 °C, zatímco u zvířecích druhů se zdá, že optimální teploty jsou vyšší, mezi 41 - 43 °C (Dong et al., 2000). Bifidobakterie jsou acidotolerantní a jejich optimální pH pro růst je mezi hodnotami pH 6,5 – 7,0. Některé druhy, jako jsou například *B. animalis* subsp. *lactis*, mohou přežívat i hodnoty okolo pH 3,5 (Matsumoto et al., 2004).

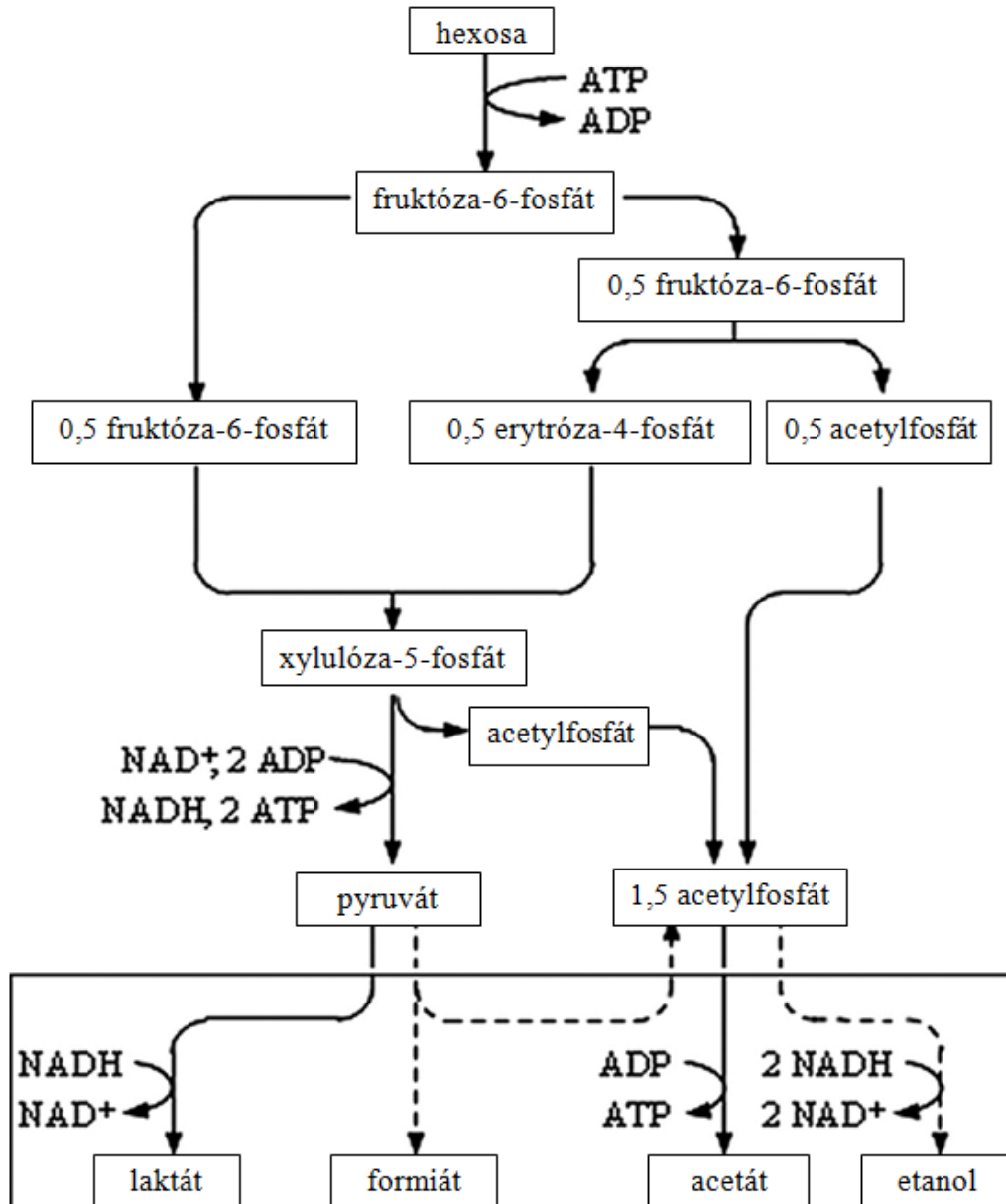
Rezistence k nízkému pH je u tohoto rodu poměrně variabilní, nicméně jedná se o důležitou vlastnost probiotických bakterií. I když jsou bifidobakterie považovány za striktně anaerobní bakterie, některé druhy jsou schopny přežívat v přítomnosti kyslíku. Zvířecí kmeny jako jsou *B. boum* a *B. thermophilum* jsou schopny růst v přítomnosti kyslíku o koncentraci 20 %. Určitá tolerance ke kyslíku byla zaznamenána i u druhů *B. animalis* subsp. *lactis* a *B. psychroaerophilum* (Kawasaki et al., 2006).

2.3.3.2 Metabolismus bifidobakterií

Bifidobakterie patří mezi sacharolytické bakterie, které produkují kyselinu mléčnou a octovou v poměru 2:3, čímž se liší od bakterií mléčného kvašení. Při kvašení různých cukrů bifidobakteriemi nikdy nevzniká kyselina máselná ani kyselina propionová. Naopak v malém množství může fermentací některých substrátů vznikat etanol a kyselina mravenčí (Amaretti et al., 2007). Bifidobakterie netvoří plyny, kromě jediné výjimky a tou je syntéza oxidu uhličitého při degradaci glukonátu (Cronin et al., 2011). Bifidobakterie, společně s dalšími bakteriemi z čeledi *Bifidobacteriaceae*, mají svou specifickou metabolickou dráhu. Klíčovým enzymem je fruktózo-6-fosfátfosfoketoláza (F6PPK), kterého se využívá i pro identifikaci bifidobakterií. F6PPK štěpí fruktózu-6-fosfát na acetylfosfát a na erytrózu-4-fosfát. Pokračování metabolické dráhy je naznačen na obrázku č. 3. Bifidobakterie fermentují glukózu, galaktózu, fruktózu a další jednoduché cukry, nicméně existují výjimky, které například glukózu štěpit neumí (Rada and Petr, 2001). Kromě jednodušších sacharidů umí některé druhy bifidobakterií využít i složitější cukry jako jsou xylooligosacharidy, fruktooligosacharidy, mucin, pektin a jiné rostlinné oligosacharidy (Cronin et al., 2011). Například u *B. breve* byl identifikován enzym, který štěpí i škrob (Pokusaeva et al., 2009). Bifidobakterie všeobecně preferují oligosacharidy před fermentací jednoduchých cukrů, zároveň preferují oligosacharidy s nižším stupněm polymerace před těmi delšími (Amaretti et al., 2007; Ventura et al., 2007). Díky analýze genomu bylo zjištěno, že bifidobakterie mohou syntetizovat vitamíny skupiny B (thiamin B1, niacin B3, pyridoxin B6, kyselina listová B11) a nejméně 19 aminokyselin (Cronin et al., 2011). Všechny druhy bifidobakterií mají genetický potenciál syntetizovat exopolysacharidy a u mnoha kmenů byly i izolovány a charakterizovány. Exopolysacharidy bifidobakterií mohou hrát důležitou roli v adherenci na

střevní epitel hostitele a zvyšovat odolnost proti žlučovým kyselinám a žaludečním šťávám (Ruas-Madiedo et al., 2006).

Obrázek č. 3: Zjednodušená metabolická dráha štěpení hexos bifidobakteriemi (Amaretti et al., 2007).



V obdélníku jsou znázorněny konečné produkty metabolismu bifidobakterií, přerušovanou čárou jsou pak znázorněny produkty, které mohou vznikat v malém množství.

2.4 Prebiotika

Další možností, jak pozitivně ovlivnit střevní mikrobiotu a podpořit rozvoj prospěšných bakterií přítomných v trávicím traktu zvířat je zařazení prebiotik do krmné dávky. 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). V tabulce č. 4 jsou popsány fyziologické vlivy dietní vlákniny na horní část gastrointestinálního traktu a tlusté střevo.

Tabulka č. 4: Vliv dietní vlákniny na fyziologii gastrointestinálního traktu (Gaggia et al., 2010).

Horní část trávicího traktu	✓ Odolnost proti strávení
	✓ Prodloužení doby trávení v žaludku
	✓ Snížená absorpce glukózy
	✓ Stimulace sekrece hormonů gastrointestinálního traktu
Tlusté střevo	✓ Substrát pro střevní bakterie
	✓ Stimulace sacharolytické fermentace
	✓ Hyperplazie epitelu v tlustém střevě
	✓ Stimulace sekrece hormonů gastrointestinálního traktu
	✓ Zvýšení objemu stolice
	✓ Ovlivnění frekvence a konzistence stolice

Prebiotika se mohou uplatňovat především ve výživě mláďat přežvýkavců, protože použití prebiotik u dospělých přežvýkavců je omezeno schopností bachorové mikrobioty degradovat většinu hostitelem nestravitelných látek, tudíž prebiotika nemohou projít až do střeva, kde by mohly splnit svoji funkci. Existuje málo studií, které se zabývají podáváním prebiotik mláďatům přežvýkavců. Většina z nich je zaměřená na ovlivnění tělesné hmotnosti mláďate a krevní parametry. Heinrichs et al. (2003) testovali mannanoligosachridy (MOS)

jako možnou přísadu do mléčných krmných směsí pro telata a zjistili, že MOS zlepšují konzistenci výkalů, ale nemají žádný efekt na váhový přírůstek.

Většina látek označovaných jako prebiotika jsou sacharidy s rozdílným stupněm polymerace a spadají do skupiny nestravitelných oligosacharidů. Tyto oligosacharidy, neboli prebiotika, jsou souhrnně označovány zkratkou NDOs z anglického spojení non-digestible oligosaccharides. Mezi nejčastěji používané oligosacharidy splňující definici prebiotik patří fruktooligosacharidy (FOS, oligofruktóza a inulin) a galaktooligosacharidy (GOS). Další oligosacharidy, které jsou používány nebo testovány jako prebiotika jsou oligosacharidy rafinosové řady (SOS), isomaltooligosacharidy, xylooligosacharidy, glukooligosacharidy, laktulosa a například mannanoligosacharidy (Qiang et al., 2009).

2.4.1 Fruktooligosacharidy a inulin

Inulin je polysacharid, který nahrazuje škrob jako zásobní látku u některých rostlin. Prebiotika inulinového typu jsou často používána, protože se běžně vyskytují v přírodě a tudíž jsou snadno dostupná. Ve vyšším množství je inulin přítomen například v čekance, topinamburu, artyčoku, cibuli a banánu (Roberfroid, 2005). Inulin je tvořen jednou molekulou glukózy a z víc jak 20 jednotek fruktózy, jedná se o polysacharid. Kratší řetězce se nazývají fruktooligosacharidy (FOS). FOS jsou tedy také složeny z D-fruktózových jednotek v lineárním řetězci spojených β (2-1) vazbami a poslední molekulou je glukóza. Označují se jako FOS typu GF_n , kde n představuje počet jednotek fruktózy. Stupeň polymerace bývá 2 – 4. FOS typu GF_n jsou neredukující cukry. Existuje i druhý oligomer typu F_n . Jedná se o homopolymer fruktózy vázaný pomocí β (2-1) vazbami, kde n je počet jednotek fruktózy. Typ F_n je redukující cukr. Fruktooligosacharidy se průmyslově vyrábí hydrolýzou inulinu, takto vyráběné FOS se nazývají oligofruktózy. Druhá možnost je syntéza ze sacharózy, pak jsou FOS nazývány neocukry.

Všechny typy oligosacharidů jsou dobře metabolizovány střevní mikrobiotou. Mezi typem GF_n a F_n není žádný rozdíl v rychlosti fermentace. Rozdíl v rychlosti fermentace nastává, když jsou FOS různé délky. Bifidobakterie snadněji metabolizují kratší řetězce (Ventura et al., 2007). Důležitou výhodou FOS je, že nejsou využívány patogenními mikroorganismy tlustého střeva (*Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*) ani bakterií *Streptococcus mutans* v dutině ústní, tudíž nepřispívají k tvorbě zubního kazu (Rudolfová a

Čurda, 2005). Grand et al. (2013) hodnotil účinek FOS podávaných telatům. Každodenní dávka FOS v mléčné náhražce zvýšila růstové přírůstky mláďat díky zvýšené aktivitě mikrobiální fermentace. Mezi další prospěšné fyziologické účinky FOS patří lepší vstřebávání minerálních látek a snížení hladiny cholesterolu (Sabater-Molina et al., 2009).

2.4.2 Galaktooligosacharidy

Galaktooligosacharidy jsou chemicky označovány souhrnným vzorcem $G(1-4)[\beta(1-6)Gal]_n$, kde n představuje počet jednotek galaktózy, $n=2-5$. Na jednu jednotku glukózy jsou vazbou $\alpha(1-4)$ vázány galaktózy, které jsou vzájemně propojené vazbou $\beta(1-6)$. Díky β -konfiguraci jsou GOS odolné proti štěpení slinami a žaludečními šťávami, protože enzymy v nich obsažené selektivně napadají α -vazby (Zhong et al., 2009). Galaktooligosacharidy jsou průmyslově vyráběny z laktózy transgalaktosylací účinkem β -galaktosidázy. Takto vyráběné GOS se nazývají transgalaktosylované oligosacharidy (TOS). Rostlinné a živočišné zdroje β -galaktosidázy nejsou používány kvůli vysoké ceně a nízké produkci. Nejpoužívanější zdroj β -galaktosidázy je kvasinka *Kluyveromyces* (Boon et al., 2000).

GOS jsou živočišného původu a nacházejí se například v lidském i v kravském mléce. I když jsou GOS metabolizovány různými střevními bakteriemi, bylo zjištěno, že bifidobakterie a do určité míry i laktobacily fermentují GOS přednostně, to znamená že GOS mají bifidogenní účinek (Macfarlane et al., 2008). Zároveň GOS zlepšují společně s probiotiky absorpci a syntézu vitamínů skupiny B (Irvine et al., 2011). V současnosti není k dispozici žádná studie zabývající se podáváním GOS mláďatům přežvýkavců.

2.4.3 Sójové oligosacharidy

Sójové oligosacharidy (SOS) bývají souhrnně označovány jako oligosacharidy rafinosové řady (RSO – raffinose series oligosaccharides). Do skupiny SOS patří především trisacharid rafinóza se souhrnným vzorcem α -D-Gal-(1-6)- α -D-Glu-(1-2)- β -D-Fru, tetrasacharid stachyóza α -D-Gal-(1-6)- α -D-Gal-(1-6)- α -D-Glu-(1-2)- β -D-Fru a pentasacharid verbaskóza α -D-Gal-(1-6)- α -D-Gal-(1-6)- α -D-Gal-(1-6)- α -D-Glu-(1-2)- β -D-Fru. Podrobně

byly RSO a jejich pozitivní efekt na růst bifidobakterií studovány hlavně v Japonsku (Lee a Salminen, 2009).

V sójových oligosacharidech je značné zastoupení galaktózy, stejně jako v GOS. Vyskytují se v luštěninách a na rozdíl od většiny oligosacharidů se SOS získávají přímo ze suroviny, není třeba enzymové výroby. V minulosti se SOS připisoval negativní účinek, tyto oligosacharidy byly považovány za antinutriční látky, které způsobují nadýmání u lidí. Dnes už je prokázáno, že mají bifidogenní účinek (Tuohy et al., 2005). Jak už bylo výše popsáno, mléčná bílkovina v mléčných krmných směsích je často nahrazována sojoproteinovými koncentráty, které obsahují okolo 70 % bílkovin a nejsou zbaveny vlákniny. Tudíž už samotná krmná náhražka může obsahovat určité množství SOS.

2.5 Synbiotika

Synbiotika představují definovanou směs probiotik a prebiotik. Prebiotikum by mělo 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 studie zaměřené spíše na podávání probiotik než na kombinaci probiotik s prebiotiky, proto je vhodné zvýšit počet *in vivo* studií zabývajících se podáváním synbiotik hospodářským zvířatům. I *in vitro* studie jsou nutné, protože komerčně dostupná prebiotika podporují probiotické bakterie, jako jsou bifidobakterie a laktobacily, ale mohou podporovat také jiné bakterie přítomné v trávicím traktu, jako jsou například klostridie a gramnegativní bakterie (Bunešová et al., 2012b; Rada et al., 2008). V současné době existuje několik studií zabývajících se podáváním synbiotik mláďatům přežvýkavců (Hasunama et al., 2011; Roodposhti and Dabiri, 2012). Často se jedná o studie, kdy je porovnáván efekt podávaného synbiotika s probiotikem a je sledován pouze váhový přírůstek u zvířete. K dispozici ale už nejsou výsledky o tom, v jakém počtu a jak dlouho přežily podané probiotické bakterie a zda prebiotika selektivně podpořila jenom probiotické bakterie. Roodposhti and Dabiri (2012) testovali vliv probiotik, prebiotik a synbiotik na váhový přírůstek telat a sledovali množství *E. coli* ve výkalech. Zjistili, že od šestého týdne věku byl vyšší průměrný denní přírůstek u telat, která denně přijímala probiotika, prebiotika i synbiotika oproti kontrole. Podobných výsledků bylo zjištěno i u množství *E. coli*, kdy autoři zjistili, že signifikantně nižší počet oproti kontrole byl od 56. dne. Z výsledků vyplynulo, že podávání synbiotik nejvíce zvýšilo váhový

přírůstek a nejvíce snížilo počet *E. coli*, ale rozdíly oproti probiotické a prebiotické léčbě nebyl statisticky významný.

3 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.

4 Cíle práce

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

5 Materiál a metody

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

5.1 Testované kmeny bifidobakterií

Pro sestavení vhodného synbiotika byly použity bifidobakteriální kmeny, které jsou uloženy 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., 2012a; 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 zkratk, které jsou používány ve vědeckých publikacích je uveden v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Testované kmeny bifidobakterií izolované z výkalů telat.

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

5.2 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. 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 (příloha 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*).

5.2.1 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* (příloha č. 1).

5.2.2 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 vybrány 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. 5 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 (příloha č. 2)

5.2.3 Vliv prebiotik na přežívání bifidobakterií v trávicím traktu

5.2.3.1 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 prebiotických byl měřen pomocí turbidometrie. Podrobná metodika je uvedena v příloze č. 3. Ve stručnosti jde o metodu, kde je do zkumavek připraveno pěstební prostředí, které obsahuje jako jediný zdroj uhlíku testované prebiotikum. Čerstvě narostlé kultury byly zaočkovány do připravených medií, které byly kultivovány při 37 °C ve vodní lázni. Během kultivace byla v půlhodinových intervalech po dobu 10 hodin měřena optická denzita. Z naměřených hodnot optické denzity byly vykresleny růstové křivky bakterií a spočítána specifická růstová rychlost. Na základě výsledků bylo sestaveno synbiotikum, které bylo podáváno telatům.

5.2.3.2 Testování vlivu prebiotik na přežívání bifidobakterií v GIT

V *in vivo* pokusu byly sledovány tři pokusné 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 v příloze č. 3).

5.3 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 příloze č. 4.

6 Výsledky a diskuze

V roce 2006 byl v Evropské unii vydán zákaz používání antibiotik ke krmným účelům. Hlavním účelem antibiotik byla prevence infekčních onemocnění a úprava složení mikrobioty gastrointestinálního traktu, čímž se docílilo lepšího využití krmiva a zvýšení přírůstků. Navíc v podmínkách velkochovu bývá nepřírozený vývoj intestinální mikrobioty mláďat přežvýkavců a díky němu častější výskyt průjmových onemocnění. Tyto okolnosti zvýšily zájem o využití probiotik ve výživě hospodářských zvířat, která by tak preventivně působila proti střevním infekcím a podporovala zdraví mláďat přežvýkavců. V současné době jsou k dispozici studie zabývající se podáváním probiotik mláďatům přežvýkavců (Frizzo et al., 2011; Morrison et al., 2010; Roodposhti and Dabiri, 2012). Problémem ale 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 přežít 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; příloha č. 5). 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 kojících se 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. Laktobacily, jako probiotika pro telata, jsou ve vědeckých studiích používány poměrně často (Abu-Tarboush et al., 1996; Maldonado et al., 2012; Timmerman et al., 2005). Kromě laktobacilů byly jako probiotika pro telata testovány například i probiotická *E. coli*, klostridie

nebo keřirové kultury (Fouladgar et al., 2016; Uyeno et al., 2013; von Buenau et al., 2005). Studií zabývající se podáváním bifidobakterií mláďatům přeřvákvců 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). Bifidobakterie pomáhají udržovat rovnováhu gastrointestinálního traktu tím, že snižují možnost bakteriální infekce. Inhibici různých druhů patogenů bifidobakteriemi dokazují mnohé studie (Dicks and Botes, 2010; Makras and De Vuyst, 2006; Servin, 2004). Bifidobakterie mohou produkovat různé antimikrobiální látky, jako jsou organické kyseliny nebo bakteriociny, které vykazují antimikrobiální aktivitu například proti *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, patogenní *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a některým kvasinkám. Podrobně je tato problematika rozepsána v příloze č. 5. U experimentálního podání bifidobakterií mláďatům přeřvákvců byla zaznamenána antimikrobiální aktivita proti *E. coli* a *Clostridium difficile* (Vlková et al., 2009; Vlková et al., 2010). Bifidobakterie mají schopnost posilovat slizniční imunitu, čímž přispívají k celkovému zlepšení zdravotního stavu zvířat (Leahy et al., 2005).

Fuller (1997) ve své publikaci popisuje hostitelskou specifitu bifidobakterií. Mezi druhy, které jsou nalézány v trávicím traktu telat, patří *B. choerinum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. longum* subsp. *suís*, *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. thermophilum* (Buneřová et al., 2012a; Kelly et al., 2016). Pro zvýšení pravděpodobnosti kolonizace je doporučeno použít kmen původně izolovaný z trávicího traktu druhu zvířete, pro který jsou daná probiotika určena. Při výběru nových probiotických bakteriálních kmenů je třeba vzít v úvahu řadu aspektů, které ovlivňují jejich účinnost. Tato problematika je podrobněji diskutována v článku Buneřová et al. (2015), který je uveden jako příloha č. 5. Probiotika musí procházet horní částí trávicího traktu v nezměněném stavu až do tlustého střeva, kde by měla v ideálním případě kolonizovat střevní epitel. Pro testování probiotických vlastností se používá řada *in vitro* testů a následně *in vivo* studií. Probiotické mikroorganismy musí odolávat velice nízkým hodnotám pH v žaludku, účinkům žlučových kyselin a působení trávicích enzymů. Probiotické bakterie by měly být schopny adherovat na střevní epitel hostitele, vykazovat antagonistické účinky vůči patogenním a potenciálně patogenním mikroorganismům a měly by celkově pozitivně ovlivňovat zdraví hostitele (Vlková et al., 2008). Izolace potenciálně nových probiotických kmenů bifidobakterií určených pro telata a jejich testování na probiotické vlastnosti proběhlo ve dvou publikovaných studiích (Buneřová et al., 2012a; Vlková et al., 2010). Díky těmto studiím bylo vybráno 10 kmenů bifidobakterií, které byly

použity pro testování různých faktorů ovlivňujících přežívání podaných probiotik v rámci této dizertační práce.

Faktorů, které mohou ovlivnit přežívání podaných probiotik, je daleko víc než jen vhodně zvolený bakteriální kmen či směs kmenů (příloha č. 6). Přežívání bifidobakterií ovlivňuje například věk telat, ve kterém jsou jim probiotika podána. Bunešová et al., (2010) testovali přežívání bifidobakterií v trávicím traktu telat v závislosti na věku. Zjistili, že pokud jsou probiotické bakterie podány novorozeným mláďatům s rozvíjející se střevní mikrobiotou, bifidobakterie jsou schopny kolonizovat trávicí trakt po delší dobu, než když byla probiotika podána telatům v pozdějším věku. Jedním z dalších faktorů ovlivňujících přežívání bifidobakterií v GIT je způsob odchovu telat a složení diety (příloha č. 1). Sledování přežívání probiotické směsi dvou kmenů bifidobakterií bylo provedeno v extenzivním pastevním chovu plemene Charolais a u telat holštýnského skotu odchovávaných intenzivním způsobem. Směs obou RRBif kmenů byla podána telatům ve věku 2 dní v obou chovech, jejich přežívání v trávicím traktu bylo sledováno kultivačně ve vzorcích výkalů, které byly odebírány v předem stanovených intervalech po dobu 26 dní. Ve věku dvou dní byly přirozeně se vyskytující bifidobakterie v počtech okolo 10^7 KTJ/g v obou sledovaných skupinách a RRBif nebyly detekovány vůbec. V 5. dni věku telat byly RRBif detekovány v množství $9,77 \pm 0,66$ log KTJ/g u extenzivního chovu skotu a v množství $7,46 \pm 0,47$ log KTJ/g u intenzivního chovu skotu. Rozdíl ve stanovených počtech byl statisticky významný. Statisticky významně vyšší počty RRBif byly zjištěny i při každém dalším odběru u telat z extenzivního chovu oproti mláďatům v chovu intenzivním. V posledním odběru, 28. den věku telat, bylo množství RRBif ve sledovaných skupinách rozdílné téměř o pět řádů. Zatímco u telat v extenzivním chovu to bylo $7,19 \pm 1,60$ log KTJ/g, tak u intenzivně odchovávaných mláďat pouze $2,40 \pm 0,80$ log KTJ/g. Po celou dobu studie byly pozorovány vyšší počty přirozeně se vyskytujících bifidobakterií u skupiny telat z extenzivního chovu, ale pouze v druhém a třetím odběru byl tento rozdíl statisticky významný. Ke konci studie byl počet bifidobakterií téměř shodný v obou sledovaných skupinách. Nejvyššího počtu bifidobakterií dosahovala telata z extenzivního chovu v 5. dni jejich věku a to v množství $9,81 \pm 0,69$ log KTJ/g, zatímco u telat z intenzivního chovu byl nejvyšší počet bifidobakterií zaznamenán až ve 14. dni věku a to v množství $9,02 \pm 0,83$ log KTJ/g.

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. 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 jejich matek. Podle Hawrelak and Myers (2004) může stres významně ovlivňovat složení mikrobioty GIT. Zatímco se množství zdravých 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 přežít 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). Některé střevní bakterie, a to i bifidobakterie, se účastní na trávení mléčných sacharidů (Garrido et al., 2012; LoCascio et al., 2007). O’Riordan et al. (2014) testovali glykosidázovou aktivitu v kravském mléce a jejich výsledky ukázali, že kolostrum vykazuje její vysokou aktivitu. Postupem času její aktivita pomalu klesá, až se dostane na svoji minimální aktivitu ve zralém kravském mléce. Zvýšené množství glykosidázové aktivity v kolostru může být spojeno s potřebou uvolnění jednoduchých monosacharidů, které by sloužily jako zdroj uhlíku pro střevní bakterie. To by korespondovalo s výsledky naší studie. Bifidobakterie přežívaly lépe u telat z extenzivních chovů, kde telata sála mateřské mléko, které je v počátcích života jediným zdrojem živin a všeobecně mají vyšší příjem kravského mléka ve srovnání s telaty z intenzivních chovů, kde jsou krmena již od 3. dne mléčnými náhradami a od 7. dne i granulovaným krmivem. Neomezený příjem kravského mléka by mohl podpořit přežívání a množení podaných bifidobakterií v trávicím traktu telat. Štěpení sacharidů pomocí glykosidázy obsažené v mléce může mít vliv na uvolnění bioaktivních sacharidů, které mohou mít imunomodulační funkci v raném vývoji GIT a mohou podpořit vznik zdravé střevní mikrobioty (O’Riordan et al., 2014). Závislost množství bifidobakterií v trávicím traktu telat na dietě dokazuje i studie, kde

telata krmená pouze kravským mlékem měla ve svém intestinálním traktu vyšší počet bifidobakterií než telata na kombinované stravě, která obsahuje vyšší množství vlákniny (Vlková et al., 2008). V naší práci byly zaznamenány nejvyšší počty bifidobakterií u pětidenních telat z extenzivního chovu, zatímco u telat v intenzivním chovu byly nejvyšší počty bifidobakterií detekovány až ve 14. dne věku. Je poměrně důležité, aby zdraví prospěšné bakterie byly v co nejvyšších počtech poměrně brzy po narození, protože imunitní systém mláďat přežvýkavců ještě není plně vyvinut (Tuohy et al., 2003).

Podané bifidobakterie byly schopny projít horní částí trávicího traktu ve vysokých počtech u telat z obou chovů. Nicméně dočasná kolonizace GIT byla silně ovlivněna způsobem odchovu. Schopnost přežívání byla vyšší u telat na mléčné dietě než u telat na kombinované.

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 (Gaggia 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 příloha 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). Bylo testováno všech 10 kmenů bifidobakterií na schopnost prokysat kravské mléko a přežít v něm po dobu šesti měsíců. Všechny testované bifidobakterie byly schopny prokysat kravské mléko ve vysokých počtech a to v rozmezí mezi 7,02 a 9,41 log KTJ/ml. Průměrný počet bifidobakterií v prokysaném mléce byl $8,26 \pm 0,62$ log KTJ/ml. Osm z deseti kmenů bylo schopno přežít v kravském mléce minimálně po dobu 2 měsíců v počtech vyšších než 10^6 KTJ/ml. Kmen *B. thermophilum* označený jako 025II byl schopen v tomto množství přežít pouze 12 dní a kmen *B. animalis* subsp. *animalis* (805P4) 26 dní. Přežívání v množství vyšším než 10^6 KTJ/ml bylo po dobu 4 měsíců zaznamenáno pouze u 5 testovaných kmenů. 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 přežít 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 a průměrný počet byl $9,03 \pm 0,22$ log KTJ/vialku. Bifidobakterie byly uchované v lyofilizované formě při pokojové teplotě a jejich množství bylo po celou dobu sledování stabilní. Průměrné počty byly ve 3, 6, 9 a 12 měsících stanoveny na $8,80 \pm 0,13$; $8,78 \pm 0,38$; $8,80 \pm 0,47$ a $8,93 \pm 0,50$ 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). Životaschopnost probiotických bakterií může být ovlivněna i způsobem rehydratace (Champagne et al., 2010). Z výsledků této studie vyplývá, že vybrané bifidobakterie dobře snášely proces lyofilizace a jejich životaschopnost byla stabilní nejméně po dobu jednoho roku.

Dalším krokem bylo *in vivo* testování obou forem probiotické směsi na dvou skupinách telat, kdy jedné byla podána směs všech deseti kmenů ve formě fermentovaného mléka a druhé ve formě lyofilizovaného prášku. Nechyběla ani kontrolní skupina, které nebylo podáno žádné probiotikum. Počty podaných bifidobakterií (RRBif) a ostatních bakteriálních skupin byly sledovány v průběhu 61 dní ve výkalech. Probiotické směsi byly telatům podány ve věku 2 dní. RRBif v obou formách byly schopny projít horní částí GIT a u pětidenních telat byly přítomny v množství vyšším než 10^9 KTJ/g u obou skupin a tento počet vydržel přibližně do 21. dne věku telat. Signifikantní rozdíl byl zaznamenán pouze ve 35. dni věku, kdy telata měla ve svém GIT vyšší počet RRBif po podání bakterií v lyofilizované formě a to v množství $8,04 \pm 0,16$ log KTJ/g oproti počtu RRBif, které byly podány ve formě fermentovaného mléka. Jejich množství bylo $7,33 \pm 0,19$ log KTJ/g. 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 výsledků uvedených ve studii v příloze č. 2 byly nalezeny

rozdíly v přežívání bifidobakterií podaných v různých formách. Prvních 14 dní po podání probiotik byly nalezeny vyšší počty bifidobakterií ve fekálních vzorcích telat u skupiny, kterým byla podána probiotika ve formě fermentovaného mléka. Od 21. dne byly detekovány podané bifidobakterie ve vyšších počtech u skupiny telat, které dostaly lyofilizovanou formu probiotik. Tento 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). Ke konci studie byly RRBif přítomné v počtech okolo 10^5 KTJ/g v obou skupinách. V některých studiích je uvedeno, že mléko obsahuje určité komponenty proteinového původu zlepšující přežívání bakterií v různých podmínkách trávicího traktu (Livney, 2010; Saxelin et al., 2010). Proto podávání probiotických bakterií ve formě fermentovaného mléka nebo lyofilizovaných bakterií za použití mléka jako kryoprotektantu může zlepšit jejich přežívání v trávicím traktu.

Celkové množství bifidobakterií bylo u dvoudenních telat přibližně 10^7 KTJ/g u obou sledovaných skupin. Tři dny po podání probiotik se celkové počty bifidobakterií v obou skupinách zvýšily více než o dva řády a počty bifidobakterií u kontrolní skupiny zůstaly stejné jako v první odběrový den. Celkové počty bifidobakterií u pokusných telat byly po zbytek studie vyšší než u telat z kontrolní skupiny a to přibližně o řád. V některé dny (5., 14., 35., 49. a 63. den) byly tyto rozdíly statisticky významné.

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 přežít v prostředí s velmi nízkým pH nebo při vysoké koncentraci žlučových kyselin, které představují podmínky GIT (Adebola et al., 2014; Michida et al., 2006). V dostupných *in vivo* studiích provedených na

mláďatech přežvýkavců, kterým byla podávána synbiotika, jsou sledovány pouze růstové parametry, popřípadě vliv na množství *E. coli* nebo složky imunitního systému (Roodposhti and Dabiri, 2012). Skutečnost, zda jsou prebiotika schopna podpořit dlouhodobé přežívání podaných probiotických bakterií ve střevě mladých přežvýkavců, nebyla dosud zkoumána *in vivo*. Cílem studie uvedené v příloze 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.

Bifidobakterie, jako většina střevních bakterií, jsou sacharolytické bakterie, které získávají energii a uhlík díky fermentaci různých monosacharidů a oligosacharidů. Mnoho oligosacharidů bylo navrženo jako prebiotika pro telata, testovány byly například mannanoligosacharidy, fruktooligosacharidy, celooligosacharidy, inulin a galaktosyl laktóza (Uyeno et al., 2015). Pro výběr vhodných synbiotických kombinací je třeba stanovit substrátové preference jednotlivých druhů a kmenů bifidobakterií (Hopkins et al., 1998). Mezi testovaná komerční prebiotika patřila Raftilosa P95, Raftilosa P85, Frutafit® IQ inulin a Vivinal®. Podle výsledků (příloha č. 3) byly fruktooligosacharidy (Raftilosa P95 a Raftilosa P85) dobrými substráty pro většinu testovaných kmenů, zatímco inulin nebyl testovanými bakteriemi využíván (kromě 022II a 025II). To je v souladu s výsledky z jiných studií, které uvádějí, že bifidobakterie preferují kratší řetězce FOS (McKellar et al., 1993; Rossi et al., 2005). Rossi et al. (2005) prokázali, že rozdíly ve schopnosti využít různě dlouhé řetězce fruktooligosacharidů je kmenově specifická. Jako další vhodný substrát pro bifidobakterie se v naší studii ukázal Vivinal®, představující galaktooligosacharidy. Komerčně dostupné GOS jsou směsi volné glukózy a oligosacharidů s různým stupněm polymerace. Zastoupení uvedených složek je u jednotlivých výrobků rozdílné, což ovlivňuje jejich využitelnost bakteriemi. Příkladem může být studie, kde testovaný kmen *B. animalis* subsp. *lactis* rostl lépe na Vivinalu®, který obsahoval 24 % monosacharidů než na GOS, které obsahovaly pouze 3 % monosacharidů (Sims et al., 2014). Na druhou stranu Hopkins et al. (1998) ve své studii uvádí, že v mnoha případech je specifická růstová rychlost bifidobakterií vyšší, pokud jsou bifidobakterie kultivovány na oligosacharidech než na monomerech. Podobně jako u FOS, i užití GOS bifidobakteriemi je kmenově specifická a pravděpodobně souvisí se sekvencí aminokyselin u β -galaktozidázy (Akiyama et al., 2015). Na základě získaných výsledků byly jako prebiotická složka vybrány Vivinal® a Raftilosa P85.

Na základě stanovených růstových parametrů bifidobakterií byla zvolena prebiotika, která byla společně, podána telatům holštýnsko-fríského skotu odchovávaných intenzivním způsobem v chovu Vražkov. Opět byly vytvořeny 3 skupiny telat. První skupině telat byla podána směs 5 kmenů RRBif ve věku 2 dnů, druhé skupině probiotikum stejné jako u první skupiny společně s prebiotikem, které ale bylo, na rozdíl od probiotik, podáváno každý den. Poslední skupina telat byla bez intervence a sloužila jako kontrola. 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 $7,28 \pm 0,54 \log$ KTJ/g u probiotické skupiny a v počtech $8,42 \pm 0,77 \log$ 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 probiotické intervence a to po celou dobu studie, nicméně již bez statisticky významného rozdílu. Množství podaných bifidobakterií se během studie pomalu snižovalo a poslední odběrový den dosahovaly počtů okolo 10^4 KTJ/g v obou skupinách. RRBif nebyly detekovány ve vzorcích u telat z kontrolní skupiny a nebyly detekovány ani před aplikací. Jednorázová aplikace bifidobakterií a podávání prebiotik telatům zvýšily počty přirozeně se vyskytujících bifidobakterií, ale tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Celkové počty bifidobakterií byly vyšší u skupiny telat, kterým byla podávána prebiotika oproti skupině probiotické a kontrolní a to v 6 odběrových dnech z osmi (není započítán den odběru, kdy byla podána probiotika). To se shoduje s výsledky studie, kde byly počty bifidobakterií v trávicím traktu telat nevýznamně vyšší u skupiny, která dostávala prebiotika oproti skupině bez prebiotik (Uyeno et al., 2013).

Nově navržená kombinace bifidobakterií původně izolovaných z výkalů telat a komerčních prebiotik (Vivinal® a Raftilosa P85) se zdá být slibným synbiotikem z hlediska podpory přežívání a aktivity podaných bakterií v intestinálním traktu telat, což je jeden z nejdůležitějších předpokladů pro funkčnost synbiotického preparátu. Navíc byla podávána prebiotika schopna podporovat proliferaci přirozeně se vyskytujících bifidobakterií.

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). Množství těchto oligosacharidů obsažených v rostlině závisí vždy na zralosti plodiny, na typu kultivaru, části rostliny a různých environmentálních faktorech (Martínez-Villaluenga et al., 2005; 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 v příloze 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). Ze všech čtyř zmíněných plodin byly získány extrahované šroty. U každého vzorku byl změřen obsah RSO. Lupina obsahovala nejvyšší množství RSO ze všech sledovaných plodin a to $8,26 \pm 0,14$ g/100 g, poměrně vysoké množství RSO obsahovala i sója ($6,96 \pm 0,21$ g/100g). Naopak malé množství RSO oproti luštěninám obsahovaly slunečnice ($1,73 \pm 0,26$ g/100g) a řepka ($1,79 \pm 0,14$ 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. Zahnutí 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).

V rámci dizertační práce byly bifidobakterie stanoveny kultivačně na selektivních pěstebních půdách. Výhodou kultivačního stanovení je možnost izolace bakteriálních kmenů, se kterými je následně možné pracovat. Mezi běžně používaná média pro selektivní stanovení bifidobakterií patří média s antibiotikem mupirocinem (příloha č. 7). Bylo ale zjištěno, že některé anaerobní bakterie, nejčastěji klostridie, jsou k mupirocinu rezistentní. Pokud jsou bifidobakterie ve vzorcích výkalů v majoritním množství, je médium obsahující mupirocin společně s kyselinou octovou dostačující. Takové médium je vhodné pro izolaci nebo stanovení počtů bifidobakterií ve vzorcích stolice novorozenců porozených přirozenou cestou nebo ve výkalech u mláďat přežvýkavců (Rada et al., 2006). Naopak nevhodné je například pro vzorky stolic novorozenců porozených císařským řezem nebo pro vzorky výkalů selat, kde zpravidla nejsou bifidobakterie dominantní skupinou bakterií (Fallani et al., 2010; Fava et al., 2007). Pokud se jedná o komplexní vzorek, kde jsou přítomny klostridie ve vyšších nebo srovnatelných počtech jako bifidobakterie, je vhodné kombinovat mupirocin s norfloxacinem. Norfloxacin byl ve studii uvedené v příloze č. 8 jediným testovaným antibiotikem, které bylo schopno potlačovat růst klostridií, zatímco počty bifidobakterií nebyly ovlivněny. Nově sestavené médium obsahující jako selektivní faktory norfloxacin v koncentraci 200 mg/l, mupirocin (100 mg/l) a ledovou kyselinu octovou (1 ml/l) bylo úspěšně použito pro stanovení počtu bifidobakterií ve vzorcích výkalů různého původu. Jeho selektivita byla 97% oproti médiu, které norfloxacin neobsahovalo (47%).

7 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 lyofilizované, byly schopny přežít v trávicím traktu v podobných množstvích. Z praktického pohledu komerčního využití v chovech skotu se proto zdá být vhodnější lyofilizovaná forma probiotik.

Podářilo 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.

8 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.
- Abu-Tarboush, H.M., Al-Saiady, M.Y., Keir El-Din, A.H., 1996. Evaluation of diet containing *Lactobacilli* on performance, Fecal Coliform, and *Lactobacilli* of young dairy calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 39–49.
- 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.
- Akiyama, T., Kimura, K., Hatano, H., 2015. Diverse galactooligosaccharides consumption by bifidobacteria: implications of β -galactosidase—LacS operon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 664–672.
- Albright, J.L., Arave, C.W., 1997. The behaviour of cattle. CAB International, Wallingford, New York, p. 306.
- Al-Lahham, S.H., Peppelenbosch, M.P., Roelofsen, H., Vonk, R.J., Venema, K., 2010. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 1175–1183.
- Amaretti, A., Bernardi, T., Tamburini, E., Zanoni, S., Lomma, M., Matteuzzi, D., Rossi, M., 2007. Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3637–3644.
- 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.
- Avila, M., Ojcius, D.M., Yilmaz, Ö., 2009. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 28, 405–411.
- Banasaz, M., Norin, E., Holma, R., Midtvedt, T., 2002. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3031–4.
- Barrow, P.A., Brooker, B.E., Fuller, R., Newport, M.J., 1980. The attachment of bacteria to

- the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 48, 147–154.
- 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.
- Becquet, P., 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 247–254.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V., 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.* 50, 117–131.
- Bindels, L.B., Porporato, P., Dewulf, E.M., Verrax, J., Neyrinck, A.M., Martin, J.C., Scott, K.P., Buc Calderon, P., Feron, O., Muccioli, G.G., Sonveaux, P., Cani, P.D., Delzenne, N.M., 2012. Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *Br. J. Cancer* 107, 1337–1344.
- Bondue, P., Delcenserie, V., 2015. Genome of bifidobacteria and carbohydrate metabolism. *Korean J. food.* 35, 1-9.
- Boon, M., Janssen, A.E., van 't Riet, K., 2000. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 271–281.
- Bottacini, F., Ventura, M., Sinderen, D., Motherway, M., 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microb. Cell Fact.* 13, S4.
- 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.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Kňazovická, V., Ročková, S., Geigerová, M., Božik, M., 2012b. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiol.* 57, 273–5.
- Bunešová, V., Vlková, E., Ročková, Š., Killer, J., Rada, V., 2010. Přežívání bifidobakterií v trávicím traktu telat v závislosti na věku. *Chov.* 12, 60-62.
- 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.
- Conly, J.M., Stein, K., 1992. The production of menaquinones (vitamin K₂) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog. Food Nutr. Sci.* 16, 307–43.

- 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.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 4–18.
- Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 1997. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin. Nutr.* 16, 3–11.
- 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.
- Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Müller, M., de Vos, W.M., 2011. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *akkermansia muciniphila*. *Front. Microbiol.* 2, 166.
- Dicks, L.M.T., Botes, M., 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: Health benefits, safety and mode of action. *Benef. Microbes.* 1, 11-29.
- Dogra, S., Sakwinska, O., Soh, S.-E., Ngom-Bru, C., Brück, W.M., Berger, B., Brüssow, H., Lee, Y.S., Yap, F., Chong, Y.-S., Godfrey, K.M., Holbrook, J.D., 2015. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *MBio* 6, e02419-14.
- Dong, X., Xin, Y., Jian, W., Liu, X., Ling, D., 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 119–125.
- Egert, M., de Graaf, A.A., Smidt, H., de Vos, W.M., Venema, K., 2006. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.* 14, 86–91.
- 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.

- Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., 2010. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51, 77-84.
- 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.
- Fava, F., Harri, M., Siljander-Rasi, H., Putaala, H., Tiihonen, K., Stowell, J., 2007. Effect of polydextrose on intestinal microbes and immune functions in pigs. *Br. J. Nutr.* 98, 123-133.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757.
- Fouladgar, S., Shahraki, A.D.F., Ghalamkari, G.R., Khani, M., Ahmadi, F., Erickson, P.S., 2016. Performance of Holstein calves fed whole milk with or without kefir. *J. Dairy Sci.* 99, 8081–8089.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24.
- 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.
- Fuller, R. 1997. *Probiotics 2nd: Applications and Practical Aspects*. Chapman and Hall. London. p. 207. ISBN: 0412736101.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S15–S28.
- Garcia-Mazcorro, J., Minamoto, Y., 2013. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Arch. Med. Vet.* 45, 111–124.
- Gardiner, G.E., Casey, P.G., Casey, G., Lynch, P.B., Lawlor, P.G., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1895–906.
- Garrido, D., Nwosu, C., Ruiz-Moyano, S., Aldredge, D., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2012. Endo- -N-acetylglucosaminidases from infant gut-associated Bifidobacteria release complex N-glycans from human milk glycoproteins. *Mol. Cell. Proteomics* 11,

775–785.

- 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.
- Godden, S.M., Fetrow, J.P., Feirtag, J.M., Green, L.R., Wells, S.J., 2005. Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 1547–1554.
- Grand, E., Respondek, F., Martineau, C., Detilleux, J., Bertrand, G., 2013. Effects of short-chain fructooligosaccharides on growth performance of preruminant veal calves. *J. Dairy Sci.* 96, 1094–1101.
- 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.
- Hammes, W.P., Hertel, C. 2007. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Hansen, P.A., Lessel, E.F. (Eds.). *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer-Verlag, New York.
- Hansen, A., Hansen, C., Krych, L., Nielsen, D., 2014. Impact of the gut microbiota on rodent models of human. *World J Gastroenterol* 20, 17727–17736.
- Hasunama, T., Kawashima, K., Nakayama, H., Murakami, T., Kanagawa, H., Ishii, T., Akiyama, K., Yasuda, K., Terada, F., Kushibiki, S., 2011. Effect of cellooligosaccharide or synbiotic feeding on growth performance, fecal condition and hormone concentrations in Holstein calves. *Anim. Sci. J.* 82, 543–548.
- Hawrelak, J.A., Myers, S.P., 2004. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern. Med. Rev.* 9, 180–97.
- Heinrichs, A.J., Jones, C.M., Heinrichs, B.S., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., Vliet, T. van, Heuvel, E. van den, 2003. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 86, 4064–9.
- Hildebrand, F., Nguyen, T.L.A., Brinkman, B., Yunta, R., Cauwe, B., Vandenabeele, P., Liston, A., Raes, J., 2013. Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biol.* 14, R4.
- 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. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514.
- Hollister, E.B., Gao, C., Versalovic, J., 2014. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* 146, 1449–1458.
- Hopkins, M.J., Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *J. Appl. Microbiol.* 85, 381–386.
- Champagne, C.P., Raymond, Y., Tompkins, T.A., 2010. The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiol.* 27, 1104–1111.
- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes* 1, 3–9.
- Christiansen, S., Guo, M., Kjelden, D., 2010. Chemical composition and nutrient profile of low molecular weight fraction of bovine colostrum. *Int. Dairy J.* 20, 630–636.
- Irvine, S.L., Hummelen, R., Hekmat, S., 2011. Probiotic yogurt consumption may improve gastrointestinal symptoms, productivity, and nutritional intake of people living with human immunodeficiency virus in Mwanza, Tanzania. *Nutr. Res.* 31, 875–881.
- Jami, E., Mizrahi, I., Bushman, F., DeSantis, T., Andersen, G., 2012. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One* 7, e33306.
- Johnsen, J.F., de Passille, A.M., Mejdell, C.M., Bøe, K.E., Grøndahl, A.M., Beaver, A., Rushen, J., Weary, D.M., 2015. The effect of nursing on the cow–calf bond. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 163, 50–57.
- Jones, R.M., Luo, L., Ardita, C.S., Richardson, A.N., Kwon, Y.M., Mercante, J.W., Alam, A., Gates, C.L., Wu, H., Swanson, P.A., Lambeth, J.D., Denning, P.W., Neish, A.S., 2013. Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *EMBO J.* 32, 3017–3028.
- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K., Niimura, Y., 2006. Response of the microaerophilic Bifidobacterium species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6854–8.

- Kelly, W.J., Cookson, A.L., Altermann, E., Lambie, S.C., Perry, R., Teh, K.H., Otter, D.E., Shapiro, N., Woyke, T., Leahy, S.C., 2016. Genomic analysis of three *Bifidobacterium* species isolated from the calf gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* 6, 30768.
- Killer, J., Kopečný, J., Mrázek, J., Rada, V., Benada, O., Koppová, I., Havlík, J., Straka, J., 2009. *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2020–2024.
- Kim, M., Kim, J., Kuehn, L.A., Bono, J.L., Berry, E.D., Kalchayanand, N., Freetly, H.C., Benson, A.K., Wells, J.E., 2014. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. *J. Anim. Sci.* 92, 683–694.
- Klein-Jobstl, D., Schornsteiner, E., Mann, E., Wagner, M., Drillich, M., Schmitz-Esser, S., 2014. Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. *Front. Microbiol.* 5, 622.
- Koike, S., Kobayashi, Y., 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 361–6.
- 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.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S., 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 663–693.
- Kristensen, N.B., Danfær, A., Agergaard, N., 1998. Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants. *Arch. für Tierernaehrung* 51, 165–175.
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., Hugenholtz, P., 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ. Microbiol.* 12, 118–123.
- 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.
- Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., Sinderen, D., 2005. Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1303–1315.
- Leavis, H.L., Bonten, M.J., Willems, R.J., 2006. Identification of high-risk enterococcal

- clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 454–460.
- Lee, J.-H., O’Sullivan, D.J., 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 378–416.
- Lee, Y.K., Salminen, S., 2009. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd edition. Wiley, Canada. p 596.
- 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., Bösch, 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.
- Livney, Y.D., 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 73–83.
- LoCascio, R.G., Ninonuevo, M.R., Freeman, S.L., Sela, D.A., Grimm, R., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., German, J.B., 2007. Glycoprofiling of Bifidobacterial Consumption of Human Milk Oligosaccharides Demonstrates Strain Specific, Preferential Consumption of Small Chain Glycans Secreted in Early Human Lactation. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8914–8919.
- Lu, L., Walker, W.A., 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1124S–1130S.
- Macfarlane, G.T., Steed, H., Macfarlane, S., 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104, 305–344.
- Makras, L., De Vuyst, L., 2006. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int. Dairy J.* 16, 1049–1057.
- Maldonado, N.C., de Ruiz, C.S., Otero, M.C., Sesma, F., Nader-Macías, M.E., 2012. Lactic acid bacteria isolated from young calves - Characterization and potential as probiotics. *Res. Vet. Sci.* 92, 342–349.
- Manning, T.S., Gibson, G.R., Link-Amster, H., 2004. Prebiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 287–298.
- Manuel, A., Rao, J.V., John, K., Aranjani, J.M., 2014. Biofilm production and antibiotic

- susceptibility of planktonic and biofilm bacteria of canine dental tartar isolates. *Acta Scientiae Veterinariae*. 42, 1202.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., Furet, J.-P., 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Vidal-Valverde, C., 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chem.* 91, 645–649.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., de La Cochetiere, M.-F., 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* 21, 167–173.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y., 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance, *International Journal of Food Microbiology*. 93, 109-113.
- Mayer, M., Abenthum, A., Matthes, J.M., Kleeberger, D., Ege, M.J., Hölzel, C., Bauer, J., Schwaiger, K., 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Vet. Microbiol.* 161, 179–185.
- Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., Kasper, D.L., 2005. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122, 107–118.
- Mckellar, R.C., Modler, H.W., Mullin, J., 1993. Characterization of growth and inulinase production by *Bifidobacterium* spp. on fructooligosaccharides. *Bifidobact. Microflora* 12, 75–86.
- 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.
- Metin, J., Yanar, M., Guler, O., Bayram, B., 2006. Growth, health and behavioral traits of dairy calves fed acidified whole milk. *Indian Vet.* 83.
- 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.
- Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., Raoult, D., 2012.

- Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb. Pathog.* 53, 100–108.
- 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.
- Nagalakshmi, D., 2009. Colostrum management and feeding in neonatal calves. *Intas Polivet* 10, 142-152.
- Neish, A., 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect.* 4, 309–317.
- Nelson, T.M., Rogers, T.L., Brown, M. V., Iken, K., Poulet, J., 2013. The Gut Bacterial Community of Mammals from Marine and Terrestrial Habitats. *PLoS One* 8, e83655.
- Nithya, V., Halami, P.M., 2013. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Ann. Microbiol.* 63, 129–137.
- O’Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., Hickey, R.M., 2014. Glycosidase activities in bovine milk over lactation. *Int. Dairy J.* 35, 116–121.
- O’Connor, E.M., O’Herlihy, E.A., O’Toole, P.W., 2014. Gut microbiota in older subjects: variation, health consequences and dietary intervention prospects. *Proc. Nutr. Soc.* 73, 441–451.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O., 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biol.* 5, e177.
- 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.
- Patterson, E., Cryan, J.F., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Dinan, T.G., Stanton, C., 2014. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proc. Nutr. Soc.* 73, 477–489.
- Phillips, C. 2002. Cattle behavior and welfare. 2nd edition. Blackwell Science Ltd. Oxford Great Britain. p 258.
- 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.
- Pokusaeva, K., O’Connell-Motherway, M., Zomer, A., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D.,

2009. Characterization of two novel alpha-glucosidases from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1135–43.
- Qiang, X., YongLie, C., QianBing, W., 2009. Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 77, 435–441.
- 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., Voříšek, 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., Nevoral, J., Trojanová, I., Tománková, E., Šmehilová, M., Killer, J., 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions. *Anaerobe* 14, 205–208.
- Rada, V., Petr, J., 2001. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Vet. Med.* 47, 1–4.
- 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.
- Rana, N., Raut, A., Khurana, S., Manuja, A., Saini, A., 2012. Isolation and biotyping of *Salmonella* and *Escherichia coli* associated with neonatal buffalo calves. *Indian J. Anim. Sci.* 82, 676–686.
- 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.
- Reinhardt, C., Bergental, M., Greiner, T., Schaffner, F., 2012. Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature* 483, 627–631.
- Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. [online]. [cit. 2015-8-2]. Dostupné také z <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831> HYPERLINK "<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&rid=1>"& HYPERLINK "<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&rid=1>"rid=1>.
- Rice, W.C., Galyean, M.L., Cox, S.B., Dowd, S.E., Cole, N.A., 2012. Influence of wet

- distillers grains diets on beef cattle fecal bacterial community structure. *BMC Microbiol.* 12, 25.
- Roberfroid, M.B., 2005. Introducing inulin-type fructans. *Br. J. Nutr.* 93, S13–S25.
- 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.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6150–8.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S., 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–5.
- Rudolfová, J., Čurda, L. 2005. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy.* 99, 168 – 174.
- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F., Zamora, S., 2009. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J. Physiol. Biochem.* 65, 315–328.
- Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Backhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M., Gordon, J.I., 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16767–72.
- 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.
- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., Järvenpää, S., Korpela, R., Mutanen, M., Hatakka, K., 2010. Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *Int.*

- J. Food Microbiol. 144, 293–300.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E., 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect. Dis.* 6, 374–382.
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 405–440.
- Sharma, R., Schumacher, U., Ronaasen, V., Coates, M., 1995. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* 36, 209–14.
- Scholz-Ahrens, K.E., Schaafsma, G., van den Heuvel, E.G., Schrezenmeir, J., 2001. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 459S–464S.
- Signorini, M.L., Soto, L.P., Zbrun, M.V., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S., 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res. Vet. Sci.* 93, 250–258.
- 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.
- Sims, I.M., Ryan, J.L.J., Kim, S.H., 2014. In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. *Anaerobe* 25, 11–7.
- Směrnice Rady 2008/119/ES ze dne 18. prosince 2008, kterou se stanoví minimální požadavky pro ochranu telat (kodifikované znění). [online]. [cit. 2017-05-21]. Dostupné z <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32008L0119>>.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 219–233.
- Timmerman, H.M., Mulder, L., Everts, H., van Espen, D.C., van der Wal, E., Klaassen, G., Rouwers, S.M.G., Hartemink, R., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2005. Health and Growth of Veal Calves Fed Milk Replacers With or Without Probiotics. *J. Dairy Sci.* 88, 2154–2165.
- Tuohy, K., Del Rio, D., 2014. Diet-microbe interactions in the gut : effects on human health and disease. Elsevier Science. ISBN: 978-0-12-407825-3.
- Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R., 2003. Using probiotics and

- prebiotics to improve gut health. *Drug Discov. Today*. 8, 692–700.
- Tuohy, K.M., Rouzaud, G.C.M., Brück, W.M., Gibson, G.R., 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics--assessment of efficacy. *Curr. Pharm. Des.* 11, 75–90.
- Umetsu, D.T., McIntire, J.J., Akbari, O., Macaubas, C., DeKruyff, R.H., 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.* 3, 715–720.
- Uyeno, Y., Kawashima, K., Hasunuma, T., Wakimoto, W., Noda, M., Nagashima, S., Akiyama, K., Tabata, M., Kushibiki, S., 2013. Effects of cellooligosaccharide or a combination of cellooligosaccharide and live *Clostridium butyricum* culture on performance and intestinal ecology in Holstein calves fed milk or milk replacer. *Livest. Sci.* 153, 88–93.
- Uyeno, Y., Shigemori, S., Shimosato, T., 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ.* 30, 126–32.
- Vasseur, E., Borderas, F., Cue, R.I., Lefebvre, D., Pellerin, D., Rushen, J., Wade, K.M., de Passillé, A.M., 2010. A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. *J. Dairy Sci.* 93, 1307–1316.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., Gupta, R.S., van Sinderen, D., 2007. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 351–372.
- Ventura, M., van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F., Zink, R., 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 205–223.
- 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.
- Vlková, E., Grmanová, M., Rada, V., Homutová, I., Dubná, S., 2009. Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. *Czech J. Anim. Sci.* 54, 552–565.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I., Killer, J., Šmehilová, M., Molatová, Z., 2008. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Arch. Anim. Nutr.* 62, 359–365.
- Vlková, E., Trojanová, I., Rada, V., 2006. Distribution of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol.* 51, 325–8.

- von Buenau, R., Jaekel, L., Schubotz, E., Schwarz, S., Stroff, T., Krueger, M., 2005. *Escherichia coli* Strain Nissle 1917: Significant Reduction of Neonatal Calf Diarrhea. *J. Dairy Sci.* 88, 317–323.
- von Wright, A., 2005. Regulating the safety of probiotics--the European approach. *Curr. Pharm. Des.* 11, 17–23.
- Voreades, N., Kozil, A., Weir, T.L., 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front. Microbiol.* 5, 494.
- Walker, M.M., Talley, N.J., 2014. Review article: bacteria and pathogenesis of disease in the upper gastrointestinal tract - beyond the era of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 39, 767–779.
- Wallace, R., Newbold, C.J. 1992. Probiotics for ruminants. In: Fuller, R. (Ed): Probiotics – The scientific basis, London, Chapman & Hall. 317-353.
- Walle, K. Vande, Vanrompay, D., Cox, E., 2013. Bovine innate and adaptive immune responses against *Escherichia coli* O157:H7 and vaccination strategies to reduce faecal shedding in ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 109–120.
- Wannaprasat, W., Koowatanukul, C., Ekkapobytin, C., Chuanchuen, R. 2009. Quality analysis of commercial probiotic products for food animal. *South Asian J of Trop Med and Pub Health.* 40, 1103-1112.
- Wikoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., Schultz, P.G., Lesley, S.A., Peters, E.C., Siuzdak, G., 2009. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3698–703.
- Yoon, S.S., Kim, E.-K., Lee, W.-J., 2015. Functional genomic and metagenomic approaches to understanding gut microbiota–animal mutualism. *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 38–46.
- Yuki, N., Shimazaki, T., Kushiro, A., Watanabe, K., Uchida, K., Yuyama, T., Morotomi, M., 2000. Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5030–4.
- Yun, J.-H., Roh, S.W., Whon, T.W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., Yoon, C., Nam, Y.-D., Kim, Y.-J., Choi, J.-H., Kim, J.-Y., Shin, N.-R., Kim, S.-H., Lee, W.-J., Bae, J.-W., 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5254–64.
- 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., Jusiewicz, 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.
- Zhong, Y., Cai, D., Cai, W., Geng, S., Chen, L., Han, T., 2009. Protective effect of galactooligosaccharide-supplemented enteral nutrition on intestinal barrier function in rats with severe acute pancreatitis. *Clin. Nutr.* 28, 575–580.
- Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D., Abee, T., de Vos, W.M., 2001. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 405–10.

9 Přílohy

Příloha č. 1:

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.

Příloha č. 2:

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.

Příloha č. 3:

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.

Příloha č. 4:

Geigerová, M., Švejstl, 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*.

Příloha č. 5:

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

Příloha č. 6:

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

Příloha č. 7:

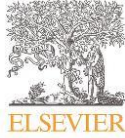
Bunešová, V., Musilová, Š., Geigerová, M., Pechar, R., Rada, V. 2015. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *Journal of Microbiological Methods*. 109, 106 – 109.

Příloha č. 8:

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.

9.1 Příloha č. 1:

Livestock Science 178 (2015) 317–321



Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/livsci



Short communication

Effect of rearing systems and diets composition on the survival of probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves



Věra Bunešová*, Eva Vlková, Martina Geigerová, Vojtěch Rada

Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague 6 165 21, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 November 2014
Received in revised form
19 June 2015
Accepted 22 June 2015

Keywords:
Probiotics
Survival
Bifidobacteria
Calves
Rearing system
Diet

ABSTRACT

The effect of rearing systems and diets composition on the survival of administered probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves was examined. Two bifidobacteria strains of calf origin with suitable physiological properties, which were identified as *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* and *Bifidobacterium longum* ssp. *suis*, were administered to 8 Charolais calves reared in an extensive farming system fed the full-milk diet and 8 Holstein calves from an intensive system fed the combined diet. Skim-milk fermented by rifampicin-resistant bifidobacteria variants of the *B. animalis* ssp. *animalis* and *B. longum* ssp. *suis* strains were administered once to 2-day-old calves. Survival of the administered bifidobacteria and the numbers of other bacterial groups in faecal samples was monitored by culturing. Probiotics administered to Charolais calves survived at higher counts than 10^7 CFU/g in the digestive tract for at least 26 days. Significantly lower bifidobacteria survival rate was observed in the Holstein calves. Three days after administration of bifidobacteria were detected in counts 10^7 CFU/g; however, their numbers rapidly dropped reaching a value of about 10^2 CFU/g on day 26 after administration. Bifidobacteria dominated the faecal flora of 5-day-old calves in both groups. Significantly higher lactobacilli counts were detected in the Charolais calves than in the Holstein calves. Our results showed that administration of probiotics is more effective in calves fed the full-milk diet reared in an extensive farming system. To achieve a probiotic effect in intensively reared animals, repeated application would probably be required, because the tested bifidobacteria were not able to colonise the digestive tract of calves fed the combined diet from an intensive rearing system.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Microorganisms are first introduced into the sterile gastrointestinal tract (GIT) of new-born calves during birth, both from the faeces and vagina of their mothers and from the environment. Colonisation patterns during early life are unstable, and new-born animals are susceptible to environmental pathogens. This initial colonisation is very important to the host because bacteria can modulate gene expression in epithelial cells to establish a favourable habitat for themselves (Siggers et al., 2007). The intestinal microbiota is stabilised after the first weeks of life, and high numbers of beneficial bacteria, such as bifidobacteria and lactobacilli, are desirable. Balance of the intestinal ecosystem in calves can be negatively impacted by rearing in intensive farming systems due to separation from their mothers, feeding with milk replacers and elimination of the benefits of cow's milk, inadequate

colostrum intake, stressful situations, and the use of antibiotics (Soto et al., 2011). Other factors, such as physiological and physical stresses, immune deficiency, infections, and the intake of certain dietary components, have also been shown to contribute to intestinal dysbiosis (Hawrelak and Myers, 2004; Stecher et al., 2013). These stressors lead to intestinal barrier dysfunction and increased intestinal permeability and can impact the microbial composition of the gut and increase susceptibility to enteric pathogens (Gareau et al., 2009). One strategy to improve the gastrointestinal microbiota of animals is the use of probiotics. A significant effect has been reported when probiotics were included in the diet of animals, particularly during stressful periods (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010). Microorganisms used in animal feed including livestock are mainly bacterial strains of gram-positive bacteria belonging to genus *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pedio-coccus*, *Streptococcus*, and strains of yeast belonging to the *Saccharomyces cerevisiae* species and *Kluyveromyces* (Anadon et al., 2006; Gaggia et al., 2010); however, interest in bifidobacteria is growing. Bifidobacteria dominate the intestinal microbiota of

* Corresponding author. Fax: +420 2 24 38 27 60.
E-mail address: bunesova@af.czu.cz (V. Bunešová).

many mammals, especially during the milk-feeding period because they are supported by the mother's milk components, and their presence in high numbers is associated with good health (Chiu et al., 2014; Russell et al., 2011; Sanchez et al., 2013). The bifidobacterial species that are most commonly used for animal feed are *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, *Bifidobacterium pseudolongum* ssp. *pseudolongum*, and *Bifidobacterium thermophilum* (Gaggia et al., 2010). Some bifidobacteria are host-specific, whereas others are common in many hosts (Bunesova et al., 2014). Bacteria that are intended for use as probiotics must meet a number of requirements. For example, they must survive passage through the upper part of the intestinal tract and remain active in the colon long enough to achieve a probiotic function. Therefore, it is important to use strains belonging to indigenous populations that were isolated from the host species for which the inoculum is intended, because they are adapted to the environment of the host GIT (Soto et al., 2011). Furthermore, administration of probiotic bacteria of bovine origin may favour the establishment of stable, balanced intestinal microbiota which would improve the health of the calf (Abe et al., 1995; Soto et al., 2011). However, the origin of the strain is not the only factor affecting its survival and activity in the intestine; the viability of administered bacteria in the colon may be affected by various exogenous and endogenous factors. Therefore, the aim of this study was to observe the effect of rearing system and diet composition on the survival of calf-origin probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves.

2. Material and methods

2.1. Bifidobacterial strains

The bifidobacterial strains administered to calves in this study were isolated in our previous experiments (Bunesova et al., 2012; Vlkova et al., 2010). Briefly, the bifidobacteria were isolated from calf faecal samples obtained during the milk-feeding period. Bifidobacteria selected for calves treatment showed auto-aggregation and antimicrobial activity, and were bile and acid tolerant; they exhibited a decrease in viability < 1 log CFU/ml after incubation for 3 h for bile tolerance and 2 h for low pH tolerance. Ten strains with suitable physiological properties were identified by 16S rRNA gene sequencing, and were used to prepare rifampicin-resistant mutants (RRBs) using a gradient plate technique. No differences in physiological characteristics were found between RRBs and original bifidobacteria. A mixture of 10 RRBs was fed to 2-day-old suckling calves. The survival of the administered strains was monitored in faeces by cultivation on selective agar containing rifampicin. The strains that survived in the intestinal tract of calves for at least 40 days at greater than 10^6 CFU/g were re-isolated and identified to the strain level by fingerprinting techniques. For the present study, we chose 2 of these strains with the best physiological properties, which were evaluated both *in vitro* and *in vivo* as described above. These strains were identified as *B. animalis* ssp. *animalis* and *B. longum* ssp. *suis*.

2.2. Animals, bacteria administration, and sampling

Probiotics bifidobacteria were administered to eight 2-day-old Charolais calves from a local farm named "Chov Charolais" (Slabce, Czech Republic) and to 8 Holstein calves of the same age from farm named "Dvorec" (Vrčeňská zemědělská, Vrčeň, Czech Republic). Rifampicin-resistant variants (RRBs) of *B. animalis* ssp. *animalis* and *B. longum* ssp. *suis* were sub-cultured in Wilkins-Chalgren broth (Oxoid). Each RRB was inoculated into 100 mL of 10% skim milk and cultivated in an anaerobic atmosphere at 37 °C overnight.

The number of bacteria in the fermented milk was approximately 10^8 CFU/mL as determined by cultivation. Each calf was fed a single dose (200 mL, containing approximately 2×10^{10} bifidobacteria) containing a mixture of both strains. None of the experimental animals was on antibiotics, and the calves were fed different diets at the two farms.

The Charolais calves were reared in an extensive farming system, and were housed with their dams and suckled. Water was available *ad libitum*. The Holstein calves were reared in an intensive farming system. These calves were removed from their dams and housed in individual pens. They were fed colostrum for 3 days and then switched to cow's milk. The milk (6–8 L) was supplied twice a day. From the age 7 days, the calves were fed a mixture of granulated feed (ČOT-S BK GP 3, 40%; Mikrop Čebín, Czech Republic) and crimped oats (60%) *ad libitum* as a starter feed. Water was also available. Granulated feed contained soybean meal, alfalfa meal, yeasts, barley, vitamin and mineral supplement and was composed from 350 g/kg of crude proteins, 57 g/kg of crude fibre, and 61 g/kg of crude fat, dry matter of the feed was 85%.

The survival of the administered RRBs and other bacterial groups was monitored in faeces by cultivation on appropriate media. Faecal samples were taken from the rectum using sterile gloves, transferred to a tube with Wilkins-Chalgren broth (Oxoid), and transported to the laboratory within 2 h. Initial samples were taken from 2-day-old calves before probiotic administration, and additional samples were obtained at 5, 9, 14, 21, and 28 days of age.

2.3. Microbiological assays

Samples were serially diluted in Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) under anaerobic conditions. RRBs were enumerated using Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L, Oxoid), L-cysteine (0.5 g/L, Sigma), Tween 80 (1 mL/L, Sigma), mupirocin (100 mg/L, Merck), rifampicin (80 mg/L, Sigma) and glacial acetic acid (1 mL/L). Total bifidobacterial counts were determined on the same medium without rifampicin supplementation (Rada and Petr, 2002), and total anaerobes were cultivated on Wilkins-Chalgren agar (Oxoid). Anaerobic bacteria were incubated in an anaerobic jar (Anaerobic Plus System, Oxoid) at 37 °C for 72 h. To enumerate lactobacilli, Rogosa agar (Oxoid) adjusted to pH 5.4 ± 0.2 with acetic acid was used, and the plates were incubated under microaerophilic conditions at 37 °C for 48 h. To create microaerophilic conditions, the first agar layer was covered with a second layer of Rogosa agar before incubation. Petri dishes containing TBX agar (Oxoid) for enumeration of *Escherichia coli* and presumptive coliforms were inoculated with 0.1 mL of an appropriate culture dilution and spread with a sterile glass rod. Plates were incubated aerobically at 37 °C for 24 h.

2.4. Statistical analyses

The mean and standard deviation of the bacterial counts were calculated. The significance of differences in bacterial counts between the Charolais and Holstein calves at the same age was evaluated by independent *t*-test. The one-sample Kolmogorov–Smirnov test of composite normality was used to test for a normal distribution. The analysis of variance (ANOVA) was applied to determine the statistical significance among bacterial counts within each group over time with 95% confidence interval. Shapiro–Wilks test was used for testing of normality. The results were processed in software Statistica (Statistica 12.0, Tulsa, USA).

3. Results

The bacterial counts and viability of the administered RRBs in faecal samples from calves reared in extensive (Charolais group) and intensive (Holstein group) farming systems are shown in Table 1. In 2-day-old calves, approximately 10^7 CFU of bifidobacteria per gram were detected in both groups. Three days after administration of the probiotic mixture (5-day-old calves), the number of bifidobacteria in Charolais calves significantly ($P < 0.05$) increased to 9.81 ± 0.69 log CFU/g. Increasing of bifidobacterial numbers was observed also in 5-day-old Holstein calves (8.35 ± 1.21 log CFU/g), however the counts were insignificantly higher compared to those detected before probiotic treatment. The number of bifidobacteria was higher in the Charolais group than in the Holstein group throughout the study period, and the differences were significant in 5- and 9-day-old calves ($P < 0.05$). In the Charolais group, the highest bifidobacterial counts were observed in 5-day-old calves, whereas in the Holstein group, the highest values were observed 9 days later. After the maximum was reached, the bifidobacteria numbers in both breeds decreased throughout the study period. The decrease was significant ($P < 0.05$) in the Charolais group 26 days after the probiotic treatment. In contrast, the changes in bifidobacterial counts were not significant ($P < 0.05$) in the Holstein calves throughout the study period. No RRBs were detected in faeces before administration. In the Charolais group, the RRBs showed very good survival during passage through the GIT, and 9.77 ± 0.66 log CFU/g were detected 3 days after administration. Then, their numbers slowly decreased to significantly ($P < 0.05$) lower counts (7.19 ± 1.60 log CFU/g) in 4-week-old calves. Significantly lower RRB counts were detected in Holstein calves than in Charolais calves during the entire experiment ($P < 0.01$). In Holstein calves, the highest numbers of RRBs were detected 3 days after administration (7.46 ± 0.47 log CFU/g), and their numbers rapidly dropped to 2.40 ± 0.80 log CFU/g by the end of the study. Significant ($P < 0.05$) decrease in RRBs was observed already 12 days after their application (4.97 ± 1.16 log CFU/g).

Similar to what was observed for the total bifidobacteria, the number of total anaerobic bacteria in Charolais calves was highest 3 days after the RRBs administration, and in Holstein calves the number was highest 12 days after the treatment. Despite the fact that there were observed changes in the numbers of total anaerobic bacteria during the study period, these changes were not significant within each group. Higher numbers of anaerobes were observed in the Charolais group than in the Holstein group throughout the experimental period, and the differences were

significant at 3 and 26 days after the probiotics administration ($P < 0.01$). Coliform bacteria, including *E. coli*, were the most numerous bacterial group identified in the faecal flora in 2-day-old calves of both breeds. Their counts then decreased slightly and remained stable until the end of the study (changes were not significant, $P < 0.05$). Three days after probiotic administration, the coliforms were replaced by bifidobacteria, which dominated in faeces, with significantly higher counts in the Charolais group ($P < 0.05$). Lactobacilli were the second most numerous bacterial group following coliforms in 2-day-old calves at 7.50 ± 2.33 and 7.56 ± 0.90 log CFU/g in Charolais and Holstein calves, respectively. Then, their numbers rapidly increased in Charolais calves (to 9.26 ± 0.51 log CFU/g) and slightly decreased in Holstein calves (to 7.25 ± 0.65 log CFU/g). Furthermore, lactobacilli were a relatively stable bacterial group with higher counts in Charolais calves than in Holstein calves, and the differences were significant in 5, 14, and 28-day-old animals ($P < 0.01$). Described changes in numbers of lactobacilli within each group were not significant ($P < 0.05$) throughout the study period.

4. Discussion

In order to persist, bacterial strains that are used as probiotics, such as orally delivered bifidobacteria, have to survive the various challenges encountered along the GIT of the host. Therefore, these strains should originate from the target species, since their host-specific background provides evidence for its ability to survive in a given environment (Lähteinen et al., 2010). GIT stresses may strongly influence the metabolic state and functionality of the bacteria (Sanchez et al., 2013). Moreover, many physiological characteristics can be species- or strain-specific, and this should be considered when selecting a probiotic strain (Bunesova et al., 2014). A strain should be selected through *in vitro* and *in vivo* studies of its probiotic properties while taking into account its benefits for the host (Dunne et al., 2001). Based on our previous studies, we chose 2 probiotic bifidobacterial strains suitable for calves (Bunesova et al., 2012; Vlkova et al., 2010). In the current study, these bifidobacteria, which were originally isolated from the faeces of healthy dairy calves, were administered to calves of 2 different breeds. The present results showed that bifidobacteria were able to survive passage through the upper intestine in both breeds; however, survival was significantly better in the calves reared in an extensive farming system. The probiotic bifidobacteria which were administered to Charolais calves (extensive system),

Table 1
Bacterial counts (mean \pm SD log CFU/g, $n=8$) in faecal samples of Charolais and Holstein calves in different age.

Age (days)	Group	Total anaerobes	Bifidobacteria	RRBs	Lactobacilli	<i>E. coli</i>	Coliforms
2	CH	10.22 \pm 0.70	7.18 \pm 1.6 ^A	< 2.00	7.50 \pm 2.33	8.98 \pm 0.57	9.04 \pm 0.62
	H	9.85 \pm 0.41	6.81 \pm 2.09 ^B	< 2.00	7.56 \pm 0.90	8.74 \pm 0.41	9.09 \pm 0.68
5	CH	10.53 \pm 0.51 [*]	9.81 \pm 0.69 ^{AB}	9.77 \pm 0.66 ^{***A}	9.26 \pm 0.51 ^{***}	8.27 \pm 0.86	8.76 \pm 0.93
	H	9.90 \pm 0.19 [*]	8.35 \pm 1.21 ^{BA}	7.46 \pm 0.47 ^{***A}	7.25 \pm 0.65 ^{***}	8.30 \pm 0.73	8.46 \pm 0.73
9	CH	10.36 \pm 0.25	9.71 \pm 0.43 ^{AB}	9.56 \pm 0.30 ^{***A}	8.92 \pm 0.65	8.09 \pm 0.66	8.37 \pm 0.62
	H	9.97 \pm 0.54	8.80 \pm 0.61 ^{BA}	5.17 \pm 0.64 ^{***ab}	7.19 \pm 2.02	8.72 \pm 0.25	8.39 \pm 0.71
14	CH	10.27 \pm 0.23	9.48 \pm 0.22 ^{BC}	8.97 \pm 0.86 ^{***A}	8.99 \pm 0.55 ^{***}	7.97 \pm 0.28	8.17 \pm 1.22
	H	10.11 \pm 0.23	9.02 \pm 0.83 ^A	4.97 \pm 1.16 ^{***ab}	6.94 \pm 1.12 ^{***}	8.52 \pm 0.75	8.53 \pm 0.74
21	CH	10.26 \pm 0.30	9.08 \pm 0.68 ^{BC}	8.93 \pm 0.56 ^{***A}	8.39 \pm 0.72	8.43 \pm 0.71	8.52 \pm 0.73
	H	10.02 \pm 0.27	9.01 \pm 1.23 ^A	3.80 \pm 2.17 ^{***bc}	7.41 \pm 0.87	8.22 \pm 1.14	8.61 \pm 0.58
28	CH	10.27 \pm 0.35 [*]	7.96 \pm 0.56 ^{AC}	7.19 \pm 1.60 ^{***B}	8.59 \pm 0.70 ^{***}	8.45 \pm 0.40	8.63 \pm 0.24
	H	9.68 \pm 0.14 [*]	7.53 \pm 0.93 ^A	2.40 \pm 0.80 ^{***c}	6.98 \pm 0.59 ^{***}	8.39 \pm 0.57	8.47 \pm 0.60

Significant differences among bacterial counts between group CH (Charolais calves) and H (Holstein calves) at the same age * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Differences among bacterial counts were evaluated within each experimental group over time. The differences were significant ($P < 0.05$) only in numbers of bifidobacteria and RRBs as indicated by the different superscript letters (^{A,B,C}Charolais calves and ^{a,b,c}Holstein calves) in appropriate columns. The superscript letters are not displayed in other bacterial groups because the differences were not significant. RRBs – rifampicin resistant bifidobacteria.

survived in the digestive tract for at least 26 days in numbers greater than 10^7 CFU/g. Significantly worse bifidobacteria survival was detected in Holstein calves (intensive farming system). Although numbers greater than 10^7 CFU/g were detected only 3 days after administration, their counts rapidly dropped reaching a value of about 10^2 CFU/g on day 26 after administration. These differences might be caused by stresses, such as separation from the mother, encountered in intensive rearing. According to (Hawrelak and Myers, 2004) stress can induce significant alterations in the GIT microflora, including a decrease in beneficial bacteria, such as lactobacilli and bifidobacteria, and an increase in potentially pathogenic microorganisms, such as *E. coli*. These changes in the microflora may be caused by the growth-enhancing effects of norepinephrine on gram-negative microorganisms or by stress-induced changes to GIT motility and secretions. Moreover, this may lead to a reduction in the ability of bifidobacteria to survive after administration. In addition, various parameters, such as diet composition and feeding practices, can also influence the microbial balance and survival of administered probiotic bacteria in the GIT (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010; Simpson et al., 2002). Consumption of various nutrients affects the structure of the microbial community and provides substrates for microbial metabolism. Bovine milk glycans and their metabolites have a wide range of associated bioactivities, including antimicrobial, prebiotic, and immunoregulatory effect (Lane et al., 2010; Recio et al., 2009). Intestinal bacteria, such as bifidobacteria, exhibit glycosidase activity and have been shown to be involved in the digestion of milk glycans (Garrido et al., 2012; LoCascio et al., 2007). O'Riordan et al. (2014) examined glycosidase activity in bovine milk and showed that colostrum contained the highest activity, and that activity decreased throughout transitional milk production to minimal but constant levels in mature milk. The elevated glycosidase activity detected in colostrum may be linked to the necessity for release of the terminal monosaccharides *in vivo* for utilisation as a carbon source by intestinal bacteria. The results of our present study showed that bifidobacteria survived better in the extensively bred Charolais calves, which were exclusively fed by sucking milk from their mothers and had higher total milk intake than intensively reared Holstein calves. Unlimited milk feeding from the cow may support the survival of the administered bifidobacteria and their multiplication in the intestine. Milk glycan digestion by glycosidases may have a role in the release or exposure of bioactive saccharides that have immunomodulatory functions in the early development of the GIT and promote the establishment of beneficial microflora in the lower digestive tract (O'Riordan et al., 2014). In addition, Vlkova et al. (2008) reported that the presence of bifidobacteria is also highly dependant on diet composition; calves exclusively fed milk have faecal flora richer in bifidobacteria than calves fed a combined diet with a high proportion of fibre. According to Signorini et al. (2012) probiotic effects depend on the composition of the inoculum and the type of system in which the animals administered the probiotics are reared. Whole milk feeding improved the probiotic effect on the incidence of diarrhoea and the ratio of lactic acid bacteria to coliforms. In our study, lactobacilli were detected in higher numbers in the group of calves on a milk-only diet (the Charolais group). Coliform bacteria dominated the faecal flora of 2-day-old calves in both breeds, and their counts decreased slightly after administration of the probiotic mixture. Insignificantly lower numbers of coliform bacteria were detected in the Charolais group. Since coliform bacteria may contribute to diarrhoeal diseases (Frizzo et al., 2011), their elimination constitutes an important factor in calf rearing. The highest numbers of bifidobacteria and total anaerobic bacteria in the Charolais group were detected in 5-day-old calves, whereas in Holstein calves, the highest numbers of these bacteria were detected at 14 days of age.

It is important to achieve high numbers of beneficial bacteria, such as bifidobacteria, as quickly as possible after birth, because the immune system is not fully developed at the early stages of life (Tuohy et al., 2003). Molecular monitoring of the intestinal microbiota of calves has shown that the microbial community undergoes dynamic changes during the first 12 weeks of life, including a reduction of health-promoting bacteria, such as bifidobacteria and lactobacilli (Uyeno et al., 2010). For healthy calf rearing, it is important to optimise the enteric flora by increasing the number of potentially beneficial microorganisms (Uyeno et al., 2013). The single probiotic administration used in our study was significantly more effective in calves reared in an extensive system than in calves reared intensively. The RRB counts detected at 4 weeks of age in the Charolais group were almost 5 orders of magnitude higher than the counts in the intensively reared Holstein group. Survival of the administered bacteria and their positive effect on intensive breeds may be improved by repeated doses of probiotic administration. According to Soto et al. (2011), periodic administration of a probiotic inoculum of bovine origin may favour the establishment of a stable, balanced intestinal microbiota, which would improve the health of the calves.

5. Conclusions

In this study, the bifidobacteria fed to calves were able to pass through the GIT in high numbers in both tested groups. However, the duration of their temporary colonisation in the intestine was strongly affected by the farming system including the diet composition and was significantly better in the extensively reared Charolais calves. To achieve a probiotic effect in intensively reared animals, repeated application would probably be required. However the potential effectiveness of periodic administration of probiotics to calves must be verified in further studies.

Acknowledgements

This study was supported by grants GP14-31984P of the Czech Science Foundation and CIGA 20132023 of the Grant Agency of Czech University of Life Sciences Prague.

References

- 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.
- Anadon, A., Martínez-Larranaga, M.R., Martínez, M.A., 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45, 91–95.
- Bunesova, V., Vlkova, E., Rada, V., Kiler, J., Musilova, S., 2014. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Benef. Microbes* 5, 377–388.
- Bunesova, V., Domig, K.J., Kiler, J., Vlkova, E., Kopečný, J., Mrazek, J., Rockova, S., Rada, V., 2012. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* 18, 166–168.
- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes* 1, 3–9.
- Chiu, Y.-H., Tsai, J.-J., Lin, S.-L., Chotirosvakin, C., Lin, M.-Y., 2014. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk. *J. Funct. Foods* 7, 700–708.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 386S–392S.
- Frizzo, L.S., Soto, L.P., Zbrun, M.V., Signorini, M.L., Bertozzi, E., Sequeira, G., Armesto, R.R., Rosmini, M.R., 2011. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livest. Sci.* 140, 246–252.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S15–S28, Supplement.

- Gareau, M.G., Wine, E., Sherman, P.M., 2009. Early life stress induces both acute and chronic colonic barrier dysfunction. *NeoReviews* 10, e191–e197.
- Garrido, D., Nwosu, C., Ruiz-Moyano, S., Aldredge, D., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2012. Endo- β -N-acetylglucosaminidases from infant gut-associated bifidobacteria release complex N-glycans from human milk glycoproteins. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 775–785.
- Hawrelak, J.A., Myers, S.P., 2004. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern. Med. Rev.* 9, 180–197.
- Lähteinen, T., Malinen, E., Koort, J.M.K., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., Pakkanen, S., Laine, H., Sillanpää, H., Söderholm, H., Palva, A., 2010. Probiotic properties of lactobacillus isolates originating from porcine intestine and feces. *Anaerobe* 16, 293–300.
- 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.
- LoCasio, R.C., Ninonuevo, M.R., Freeman, S.L., Sela, D.A., Grimm, R., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., German, J.B., 2007. Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8914–8919.
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., Hickey, R.M., 2014. Glycosidase activities in bovine milk over lactation. *Int. Dairy J.* 35, 116–121.
- Rada, V., Petr, J., 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Vet. Med.* 47, 1–4.
- 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: Corredig, M. (Ed.), *Dairy-Derived Ingredients: Food and Nutra-ceutical Uses*, pp. 170–211.
- Russell, D.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 88–105.
- Sanchez, 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.
- Siggers, R.H., Thymann, T., Siggers, J.L., Schmidt, M., Hansen, A.K., Sangild, P.T., 2007. Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate. *Livest. Sci.* 109, 14–18.
- Signorini, M.L., Soto, L.P., Zbrun, M.V., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S., 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res. Vet. Sci.* 93, 250–258.
- 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.
- Soto, L.P., Frizzo, L.S., Avataneo, E., Zbrun, M.V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Signorini, M.L., Rosmini, M.R., 2011. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165, 176–183.
- Stecher, B., Maier, L., Hardt, W.-D., 2013. 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 277–284.
- Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W., Gibson, G.R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov. Today* 8, 692–700.
- Uyeno, Y., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., 2010. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 570–577.
- Uyeno, Y., Kawashima, K., Hasunuma, T., Wakimoto, W., Noda, M., Nagashima, S., Akiyama, K., Tabata, M., Kushibiki, S., 2013. Effects of cellooligosaccharide or a combination of cellooligosaccharide and live *Clostridium butyricum* culture on performance and intestinal ecology in Holstein calves fed milk or milk replacer. *Livest. Sci.* 153, 88–93.
- Vlkova, E., Rada, V., Trojanova, I., Killer, J., Smešilova, M., Molatova, Z., 2008. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Arch. Anim. Nutr.* 62, 359–365.
- Vlkova, E., Grmanova, M., Killer, J., Mrazek, J., Kopečný, J., Bunesova, V., Rada, V., 2010. Survival of bifidobacteria administered to calves. *Folia Microbiol.* 55, 390–392.

Persistence of bifidobacteria in the intestines of calves after administration in freeze-dried form or in fermented milk

M. GEIGEROVÁ, E. VLKOVÁ, V. BUNEŠOVÁ, V. RADA

Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

ABSTRACT: In order to improve the gut microbiome of calves, probiotic bacteria can be fed as active living-cells (fermented milk), or as live but inactive (freeze-dried) cultures. Ten bifidobacterial strains with suitable probiotic properties (as determined in our previous study) were tested for survival during the freeze-drying process, and screened for their ability to ferment cow's milk. The viability of both freeze-dried and live-cell cultures during storage was also tested. All of the strains tested were able to ferment cow's milk, with average counts of 8.26 ± 0.62 log CFU/ml. Eight out of the ten strains were able to survive in milk for 2 months in counts higher than 10^6 CFU/ml. Bifidobacteria showed high viability following the freeze-drying process, with average numbers of 9.03 ± 0.22 log CFU/vial and did not decrease after 12 months of storage. The mixture of rifampicin-resistant variants of bifidobacteria (RRBs) was fed to 2-day-old dairy Charolais calves in the form of living-cells, or as freeze-dried bacteria. The control group was given no probiotics. Survival of the RRBs administered and the numbers of other bacterial groups in faecal samples was monitored by culturing. Bifidobacteria that were administered passed successfully through the upper parts of the gastrointestinal tract, and were found in numbers higher than 10^9 CFU/g for two weeks. RRBs colonized the intestines of calves for at least 63 days in both treatment groups. Significantly higher total counts of bifidobacteria were found in the treated groups, compared to the control group. Reduction in *Escherichia coli* and total coliforms numbers, and an increase in lactobacilli counts were observed in both experimental groups following the application of the probiotic mixtures. Our results show that both forms of administering probiotic bifidobacteria to calves are effective, but that the freeze-dried form is more suitable from a practical viewpoint.

Keywords: probiotic bacteria; technological properties; storage conditions; gut; young ruminants

INTRODUCTION

Antibiotics have been used to prevent and control intestinal infections in young ruminants for many years. However, the widespread usage of antibiotics in livestock has led to antibiotic residues found in animal products, and increased the emergence of drug-resistant bacteria in human beings (Abu-Tarboush et al. 1996). In addition to the need to reduce infectious disease in cattle, other important aspects are considered, including animal welfare,

quality control of animal products, public health issues, and odours from animal farms, which are related to the gastrointestinal microbiota, and need to be addressed (Awati 2014). Therefore, there is a need to replace antibiotics in animal feeds with other additives that would positively influence the composition of intestinal microbiota and improve livestock health. Many additives have been proposed for these purposes (Roodposhti and Dabiri 2012; Del Razo-Rodriguez et al. 2013; Hu et al. 2014). One strategy becoming more common

Supported by the Czech Science Foundation (GA ČR) (Grant No. 14-31984P) and by the Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (CIGA) (Project No. 20142013).

with cattle is the administration of probiotics. Probiotics are defined as “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (FAO/WHO 2002). Many studies have focused on the effect of probiotic applications on growth performance and animal health (Timmerman et al. 2005; Frizzo et al. 2010). A meta-analysis conducted by Frizzo et al. (2011) showed that probiotics increase body weight gain and improve feed efficiency. Recent research has demonstrated that the effects of probiotic bacteria can reach far beyond the gastrointestinal tract. Documented benefits include decreased mortality, improved immune function, and increased milk production (Maamouri et al. 2014). Although the positive impact of probiotic preparations has been clearly demonstrated, studies focused specifically on the ability of applied probiotic bacteria to colonize the intestinal tract are limited.

Different microorganisms are used as probiotics in ruminants. More than 60 bacterial, fungal, and yeast species are available for commercial use. Frequently used probiotic microorganisms include strains of lactic acid bacteria, *Propionibacterium* spp., *E. coli*, *Saccharomyces* yeast, and undefined mixed culture (Simon et al. 2001). Selection of suitable probiotic species is dependent on the age of the host. The rumen of dairy calves is not developed yet; therefore, probiotics are selected to target the intestines. Bifidobacteria and lactobacilli are suitable probiotic bacteria for calves, as these genera are an important part of their intestinal microbiota (Uyeno et al. 2010). Thus, it is an appropriate strategy to attempt to increase the counts of these potentially beneficial bacteria of young ruminants. Some strains of bifidobacteria are host-specific (Bunesova et al. 2014). Therefore, it is important for the donor and recipient animals to be of the same species. Probiotic strains can be administered as active living-cells or in an inactive form, including spray-dried, frozen, or freeze-dried microorganisms. All listed variants have been verified as suitable for preservation and distribution of probiotics (Carvalho et al. 2004).

In a previous study from our group, *in vitro* tests were used to identify specific strains of bifidobacteria originating in calves as having suitable functional properties to act as probiotics. These strains temporarily colonized the gastrointesti-

nal tract of calves after their administration in fermented milk (Vlkova et al. 2010). However, for the large-scale application of bifidobacteria to calves, a freeze-dried variant of the bacteria is preferred. The question is whether the form, in which the probiotics are administered, would affect their ability to colonize the digestive tract of calves. Therefore, the aim of this study was to compare the survival ability of bifidobacteria in the gastrointestinal tract, applied to 2-day-old dairy calves in the form of live-cells or as freeze-dried bacteria.

MATERIAL AND METHODS

Bifidobacterial strains used and determination of stability in fermented milk or during storage as freeze-dried cultures. Bifidobacterial strains administered to calves in this study were collected in a previous experiment (Vlkova et al. 2010). Briefly, bifidobacteria were isolated from faecal samples of calves during the milk-feeding period and characterized by *in vitro* tests. Ten strains with suitable physiological properties were identified by sequencing the *16S rRNA* gene. Six strains were identified as *B. animalis* subsp. *animalis* (strains code: 023 II, 805 P4, 012 III, 017 III, 805 III, 813 P2), two as *B. thermophilum* (strains code: 017 III2, 025 II), one strain was identified as *B. longum* subsp. *suis* (strain code: 022 II), and one as *B. choerinum* (strain code: 023 I2). We then generated rifampicin-resistant mutants (RRBs) from these strains, using a gradient plate technique. No differences in physiological and biochemical characteristics were found between RRBs and the original strains (Vlkova et al. 2010). Rifampicin resistance is rare among bifidobacteria and enabled us to differentiate microorganisms administered for the study from the endogenous wild-type strains (Rada et al. 1995).

Bifidobacterial strains were screened for their ability to ferment cow's milk and survive under these culture conditions. Milk was prepared from low-fat dried milk (10 g/100 ml of distilled water), 10 ml aliquots were distributed into tubes, boiled for 30 min, hermetically closed, and cooled to 37°C. Overnight growth cultures were inoculated at about 1×10^7 CFU to the milk, the milk was anaerobically fermented for 24 h at 37°C, and bifidobacterial counts were determined by anaerobic cultivation on modified Wilkins-Chalgren agar

doi: 10.17221/8727-CJAS

(Oxoid, Basingstroke, UK) supplemented with soya peptone (5 g/l; Oxoid). Fermented milk was stored at 4°C and survival of bifidobacteria was determined at approximately one-week intervals for 6 months by cultivation as described above.

The ability of bifidobacteria to survive the freeze-drying process was tested as follows. Ten ml of overnight cultures at density of 10^8 CFU/ml were collected by centrifugation and resuspended in 10 ml of 10% skim-milk, which served as a lyoprotectant. Glass vials with 10 ml of bacterial suspensions were frozen to -75°C for 30 min, freeze-dried (HetoPowerDry LL3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) under vacuum for 24 h, and hermetically closed with rubber stoppers before opening the drying chamber. Freeze-dried bifidobacteria were kept at room temperature, and their survival during storage was monitored in three-month intervals for 12 months by cultivation on modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/l; Oxoid). For each analysis, a new vial with freeze-dried bacteria was used.

Animals, bacteria administration, and sampling. Bifidobacteria were administered to 2-day-old Charolais calves from a local farm ("Chov Charolais", Slabce, Czech Republic). There were two experimental groups. In the first group (fermented milk; FM), eight animals were fed from bottle with a single dose of a mixture of ten 10% skim-milk cultures (10 ml) fermented by the 10 different RRBs strains listed above. The total amount of fermented milk fed was 100 ml, and contained approximately 10^{10} bifidobacterial cells. The second experimental group (lyophilized bacteria; LB) also comprised eight animals, and they were fed from bottle with a single dose of the mixture of freeze-dried bacteria, resuspended in 100 ml of 10% skim-milk immediately before feeding. Identically to the FM group, 10^9 of each of the 10 strains of RRBs were administered, for a total dose of 10^{10} cells. Eight calves from the same farm with no probiotic treatment were used as a control (C). All groups were housed separately, and none of the animals (both calves and their dams) in this study was treated with antibiotics, coccidiostats or other inhibitory substances. Calves were housed with their dams, and suckled with no additional feed. Water was available *ad libitum*.

Survival of administered RRBs and other bacterial groups was monitored in faeces of all calves

included in experiment by cultivation. Faecal samples were collected from the rectum using sterile gloves, transferred to a tube with Wilkins-Chalgren broth (Oxoid), and transported within 2 h to the laboratory. Samples were collected from 2-day-old calves and animals were re-sampled at 5, 10, 14, 21, 35, 49, and 63 days of age.

Microbiological assays. Samples were serially diluted in the Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) under anaerobic conditions. RRBs were enumerated using Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/l; Oxoid), L-cystein (0.5 g/l; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Tween 80 (1 ml/l; Sigma), mupirocin (100 mg/l; Merck, Kenilworth, USA), rifampicin (80 mg/l; Sigma), and glacial acetic acid (1 ml/l). Total bifidobacterial counts were determined by the same medium without rifampicin (Rada and Petr 2000), and total anaerobes were cultivated on Wilkins-Chalgren (Oxoid). Anaerobic bacteria were incubated in anaerobic jar (Anaerobic Plus System, Oxoid) at 37°C for 72 h. To enumerate lactobacilli, cells were cultured on Rogosa agar (Oxoid) adjusted to pH 5.4 ± 0.2 with acetic acid, and plates were incubated under micro-aerophilic conditions at 37°C for 72 h. To create micro-aerophilic conditions, the first agar layer was covered with a second layer of Rogosa agar, before incubation. For enumeration of *E. coli* and total coliforms, 0.1 ml of a diluted sample was inoculated to Petri dishes with TBX agar (Oxoid), and spread using sterile glass rods. Plates were incubated aerobically at 37°C for 24 h.

Statistical analyses. Bacterial counts were expressed as the mean with standard deviation. Analysis of variance (one way ANOVA) was applied to determine the statistical significance between tested groups of calves with a 95% confidence interval. Scheffe's method (post-hoc test) was used to determine differences between tested groups. The Shapiro-Wilk test was used to test normality of the population. The results were processed using STATISTICA software (Version 12.0, 2013).

RESULTS

Bifidobacteria survival in fermented milk or when stored as freeze-dried cultures. The tested bifidobacteria showed good ability of growth in cow's milk and after 24 h of cultivation in milk they were present in counts ranging from 7.02 to 9.41 log CFU/ml, with an average of 8.26 ± 0.62 log CFU/ml.

Eight out of 10 strains survived in fermented milk for 2 months with counts $> 10^6$ CFU/ml; one strain (025 II) attained this level for only 12 days, and one (strain 805 P4) survived for 26 days with counts $> 10^6$ CFU/ml. Viability higher than 10^6 CFU/ml for 4 months was observed for five of the strains.

Resistance to the freeze-drying process and the stability of lyophilized cultures during storage was similarly assayed. Immediately following freeze-drying (approximately 10^9 CFU of each strain was freeze-dried), bacterial numbers varied between 8.84 and 9.35 log CFU/vial, with an average of 9.03 ± 0.22 log CFU/vial. Bacterial viability during storage at room temperature was stable for the duration of the study. The means of bacterial counts were 8.80 ± 0.13 , 8.78 ± 0.38 , 8.80 ± 0.47 ,

and 8.93 ± 0.50 log CFU/vial, after 3, 6, 9, and 12 months, respectively.

Enumeration of faecal bacteria from calves and detection of administered bifidobacteria. The counts of RRBs and additional groups of bacteria determined from faecal samples collected from all experimental calves are shown in Table 1. Approximately 10^7 CFU/g of bifidobacteria were detected in the faeces of 2-day-old calves in both experimental groups, which was significantly ($P < 0.05$) lower than numbers of bifidobacteria detected in control calves. Three days following administration of the probiotic mixtures, the numbers of bifidobacteria increased to 9.95 log CFU/g, as detected in the FM group, and to 9.55 log CFU/g in the LB group (Table 1). These counts were significantly ($P < 0.05$)

Table 1. Bacterial counts (log CFU/g \pm SEM, $n = 8$) in faeces of calves fed a mixture of lyophilized bacteria (LB) or fermented milk (FM), and of calves in the untreated control (C) group at various times of experiment

Age (days)	Group	Total anaerobes	Bifidobacteria	RRBs	Lactobacilli	<i>E. coli</i>	Coliforms
2	FM	10.01 ± 0.39^A	7.03 ± 0.02^A	< 2.00	6.11 ± 1.84^A	8.99 ± 0.10^A	9.02 ± 0.14^A
	LB	9.49 ± 0.21^A	7.03 ± 0.01^A	< 2.00	6.48 ± 0.18^A	8.58 ± 0.07^{AB}	8.68 ± 0.11^A
	C	9.59 ± 0.01^A	7.83 ± 0.31^B	< 2.00	7.41 ± 0.60^A	8.05 ± 0.22^B	8.52 ± 0.07^A
5	FM	10.68 ± 0.21^A	9.95 ± 0.03^A	9.79 ± 0.32^A	9.08 ± 0.23^A	8.50 ± 0.34^A	9.14 ± 0.07^A
	LB	10.10 ± 0.13^{AB}	9.55 ± 0.46^A	9.60 ± 0.35^A	8.30 ± 0.47^A	8.81 ± 0.10^A	8.98 ± 0.01^A
	C	9.31 ± 0.36^B	7.83 ± 0.36^B	< 2.00	7.95 ± 0.64^A	8.58 ± 0.31^A	8.92 ± 0.10^A
10	FM	10.42 ± 0.15^A	9.46 ± 0.40^A	9.41 ± 0.14^A	8.90 ± 0.31^A	7.92 ± 0.45^A	8.53 ± 0.33^A
	LB	10.10 ± 0.28^A	9.36 ± 0.13^A	9.29 ± 0.15^A	9.09 ± 0.00^A	8.03 ± 0.07^A	8.91 ± 0.07^A
	C	10.03 ± 0.26^A	9.12 ± 0.66^A	< 2.00	8.68 ± 0.31^A	9.03 ± 0.26^A	9.10 ± 0.18^A
14	FM	10.34 ± 0.22^A	9.40 ± 0.31^A	9.15 ± 0.00^A	8.83 ± 0.14^A	8.08 ± 0.13^A	8.31 ± 0.16^A
	LB	10.20 ± 0.07^A	9.22 ± 0.01^{AB}	9.15 ± 0.23^A	9.12 ± 0.05^A	8.05 ± 0.35^A	8.69 ± 0.63^A
	C	10.10 ± 0.02^A	8.51 ± 0.19^B	< 2.00	8.95 ± 0.20^A	8.33 ± 0.11^A	8.97 ± 0.08^A
21	FM	10.41 ± 0.16^A	9.16 ± 0.49^A	8.86 ± 0.52^A	8.14 ± 0.24^A	8.31 ± 0.13^A	8.41 ± 0.15^{AB}
	LB	10.25 ± 0.44^A	9.20 ± 0.16^A	9.13 ± 0.14^A	8.75 ± 0.29^A	7.41 ± 0.07^B	7.49 ± 0.07^B
	C	10.13 ± 0.02^A	8.53 ± 1.01^A	< 2.00	8.50 ± 0.51^A	8.57 ± 0.05^A	9.16 ± 0.41^A
35	FM	9.95 ± 0.03^A	7.60 ± 0.00^A	7.33 ± 0.19^A	8.13 ± 0.36^A	8.21 ± 0.01^A	8.23 ± 0.02^A
	LB	9.76 ± 0.04^A	8.21 ± 0.13^B	8.04 ± 0.16^B	8.92 ± 0.16^A	5.90 ± 0.01^B	6.19 ± 0.18^B
	C	9.90 ± 0.02^A	6.16 ± 0.03^C	< 2.00	8.11 ± 0.54^A	8.60 ± 0.23^A	8.62 ± 0.21^A
49	FM	9.40 ± 0.09^A	7.30 ± 0.30^{AB}	5.78 ± 0.03^A	8.44 ± 0.10^A	7.39 ± 0.60^A	7.66 ± 0.07^A
	LB	9.30 ± 0.11^A	8.04 ± 0.46^A	6.00 ± 0.12^A	8.32 ± 0.06^A	6.08 ± 0.21^A	6.22 ± 0.12^A
	C	9.10 ± 0.26^A	6.12 ± 0.14^B	< 2.00	7.73 ± 0.55^A	7.61 ± 0.07^A	7.67 ± 0.27^A
63	FM	9.05 ± 0.04^A	7.07 ± 0.12^A	5.29 ± 0.58^A	7.63 ± 0.09^A	7.15 ± 0.05^A	7.19 ± 0.05^A
	LB	9.11 ± 0.01^A	7.56 ± 0.09^A	5.55 ± 0.34^A	7.96 ± 0.23^A	6.19 ± 0.01^A	6.42 ± 0.00^A
	C	9.21 ± 0.58^A	5.58 ± 0.24^B	< 2.00	8.13 ± 0.13^A	7.68 ± 0.30^A	7.82 ± 0.31^A

RRBs = rifampicin-resistant variants of bifidobacteria

^{A-C} values in columns at the same age with no common superscripts significantly differ ($P < 0.05$)

doi: 10.17221/8727-CJAS

higher compared to the control group (7.83 log CFU/g) (Table 1). Numbers of total bifidobacteria were higher in both experimental groups than in the control for the duration of the study; statistical significance for the differences was observed for days 5, 14, 35, 49, and 63. Non-significantly higher counts of bifidobacteria were seen in the FM group, in comparison with LB group, for the first 3 sampling dates after treatment. Thereafter, bifidobacteria were consistently more numerous in the LB group through to the end of the study, with a significant difference on day 35. No RRBs were detected in faecal samples from all calves before their administration, or in the control group for the duration of the study. The RRBs administered demonstrated robust survival in the gastrointestinal tracts of calves in both experimental groups; three days after application, RRBs reached counts of 9.79 and 9.60 log CFU/g in the FM and LB groups, respectively (Table 1). Their levels gradually decreased as the trials continued, but 2 months following treatment, RRBs were still found in numbers higher than 10^5 CFU/g. RRBs were more numerous in the FM group on days 5 and 10; thereafter, the numbers were identical until day 21 of the experiment, where RRBs showed higher number in LB group, and remained higher until the end of the study. The difference was significant only on day 35.

Total anaerobic bacteria were found in similar numbers in all calves, reaching a maximum on day 5 in the FM group, and on day 21 in the LB and control groups. The highest counts were found in calves fed fermented milk during the whole experiment, and the numbers were significantly ($P < 0.05$) higher compared to the control group on day 5. Lactobacilli were present in the lowest numbers in 2-day-old calves, and their counts increased rapidly, particularly in both experimental groups 3 days following bifidobacteria application. Numbers were relatively stable during the whole experiment reaching counts between 7.63 and 9.12 log CFU/g (Table 1). The numbers of lactobacilli exceeded bifidobacteria in the control group on days 5 and 14, and in all groups from 35-day-old calves. Coliform bacteria, including *E. coli*, varied in counts between 10^8 and 10^9 CFU/g in the first 2 weeks of the calves' life. Decreasing numbers were measured, starting from the 3rd week of life in calves treated with lyophilized bacteria (LB group); a similar reduction of coliforms was delayed in the FM

and control groups on day 49. On days 21 and 35, significantly ($P < 0.05$) lower counts of *E. coli* and total coliforms in the LB group compared to both the FM and control groups were detected.

DISCUSSION

Probiotic bacteria may be applied to a host as active living-cells, or as inactive, usually freeze-dried, cells (Fasoli et al. 2003). Because milk is an appropriate nutritive source for microbial growth (Quigley et al. 2013), one way to administer probiotics to calves is by feeding them milk fermented by probiotic cultures. After the fermentation process and during the storage period, the number of probiotic microorganisms in the product should remain at least at 10^6 CFU/ml to achieve the desired functions in the gut (Vinderola et al. 2000). All bifidobacteria tested in this study were able to ferment cow's milk, reaching counts higher than 10^7 CFU/ml, and most of the strains tested remained viable at the required levels for at least 2 months. The advantage of using fermented over non-fermented (sweet) milk is that the milk is preserved for several weeks by bacterial acidification (Bayram et al. 2007). A disadvantage of feeding probiotics in the fermented milk form is the large volume required, compared to freeze-dried probiotics. Expanding interest in the usage of probiotics as a regular contributor to livestock nutrition has placed greater emphasis on promoting high cell viability during storage, and maintaining this high activity at the site of action. A suitable approach for probiotics preservation is freeze-drying (Carvalho et al. 2004), but this process sometimes causes the loss of bacterial viability due to ice crystal formation and rupture of cell membranes (Poddar et al. 2014). The viability of dried bacteria depends also on the method used for their rehydration (Champagne et al. 2010). Our results indicate that the bifidobacteria tested were resistant to the freeze-drying process, and their viability was stable for at least one year. Moreover, bacteria fed to calves passed the upper parts of the gastrointestinal tract successfully, and colonized the gut for more than 2 months.

Numerous studies have reported beneficial effects of probiotics on the health status and performance of calves (Mudgal and Baghel 2010; Bayatkouhsar et al. 2013; Qadis et al. 2014; Soto et al. 2014). Most of the experiments showed increased weight

gain and improved feed conversion ratios, but few studies also monitored a long-term survival of the probiotics administered. Moreover, a detailed description of inoculum used in studies was often missing. Therefore, our study was focused on monitoring the persistence of bifidobacteria fed to calves in faecal samples. Bifidobacteria administered in both forms (as active live-cells in fermented milk or as freeze-dried inactivated cells) showed high survivability in the gastrointestinal tract, being found in faecal samples in numbers higher than 10^7 CFU/g five weeks after the treatment. It has been suggested that some components of milk, especially milk proteins, enhance the survival of bacterial strains under different conditions (Livney 2010; Saxelin et al. 2010). Therefore, the administration of probiotics in milk, or as bacteria freeze-dried using milk as a cryoprotectant, may help improve their survival in the digestive tract. Rochet et al. (2008) assessed the survival of *B. animalis* in adults after ingestion in fermented milk or as a freeze-dried product. The gastrointestinal survival of the strain tested was equally good for both applications. Our results showed that there were significant differences in the survival of bacteria if administered live or freeze-dried. Bifidobacteria were found in faecal samples in higher counts after their application in fermented milk, 14 days after treatment. From day 21 there was a higher number of bifidobacteria in the freeze-dried group than in the fermented milk group. This difference was probably due to the form of administration, as freeze-dried bacteria need time for re-activation in the intestine. The osmotic conditions and pH of the intestine, and the availability of an appropriate nutritional energy source may affect the rate of recovery to a viable state (Costa et al. 2000).

The total numbers of bifidobacteria in the calf faeces samples rapidly increased after the administration of RRBs strains in both treatment groups. An increase was also measured in the control group, but at later times in the study. The counts of bifidobacteria in both experimental groups were significantly higher than counts in the control group during the whole study, except for day 2. We additionally observed the effect of administration of bifidobacteria on other bacterial groups in the digestive tract of calves. One group of intestinal bacteria we examined were lactobacilli, as they are also probiotic bacteria, and a common constituent

of the intestinal microbiota of calves (Maldonado et al. 2012). Three days after the application of probiotics, the number of lactobacilli was insignificantly higher in both experimental groups compared to the control, but the differences were not significant (Table 1). This finding is consistent with the results obtained by Vlkova et al. (2009), who observed a slight increase in lactobacilli numbers after feeding bifidobacteria to lambs.

Coliform bacteria, particularly *E. coli*, are causal agents of diarrhoea in calves and it is therefore desirable to reduce their numbers (Moore 2004). In this study, faecal samples from calves fed freeze-dried bifidobacteria had significantly lower numbers of coliform bacteria and *E. coli* on days 21 and 35, compared to untreated calves and calves treated with probiotic fermented milk (Table 1). The group receiving fermented milk also had non-significantly lower counts of *E. coli* and coliforms in their faecal samples, compared to the control group, after the 5th day of life. Roodposhti and Dabiri (2012) reported similar results after administration of a multi-strain probiotic mixture to calves, finding significantly reduced *E. coli* numbers in faeces compared with untreated controls. Two mechanisms by which probiotic microorganisms can reduce *E. coli* and other bacteria present in the environment have been proposed. One is the production of inhibitory substances by probiotic bacteria. Bifidobacteria are able to synthesize organic acids, and some strains also produce bacteriocins (Martinez et al. 2013). The second proposed mechanism of probiotic action against pathogenic or potentially pathogenic bacteria is competitive inhibition of adherence to the intestinal mucus and epithelial cells (Roodposhti and Dabiri 2012).

CONCLUSION

Experimental data from *in vivo* testing of bifidobacteria administration as a freeze-dried product or in fermented milk demonstrated that both forms of probiotics are suitable for feeding to calves. At least some strains from the bifidobacterial mixture applied in this study were stable during gastrointestinal passage, and were able to colonize the digestive tract of calves for at least 63 days. Nevertheless, due to a longer shelf life, and the possibility to feed probiotics in smaller volumes, the freeze-dried form of bacteria is preferable.

doi: 10.17221/8727-CJAS

REFERENCES

- Abu-Tarboush H.M., Al-Saiady M.Y., Keir El-Din A.H. (1996): Evaluation of diet containing lactobacilli on performance, fecal coliform, and lactobacilli of young dairy calves. *Animal Feed Science and Technology*, 57, 39–49.
- Awati A.A. (2014): Think outside the gut! Effects of probiotics on animal performance and the environment. *International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics – IPC2014, Budapest, Hungary*, 14.
- Bayatkouhsar J., Tahmasebi A.M., Naserian A.A., Mokarram R.R., Valizadeh R. (2013): Effect of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Animal Feed Science and Technology*, 186, 1–11.
- Bayram B., Yanar M., Guler C., Metin J. (2007): Growth performance, health and behavioural characteristics of Brown Swiss calves fed a limited amount of acidified whole milk. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 273–279.
- Bunesova V., Vlkova E., Rada V., Killer J., Musilova S. (2014): Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*, 5, 377–388.
- 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. *International Dairy Journal*, 14, 835–847.
- Champagne C.P., Raymond Y., Tompkins T.A. (2010): The determination of viable counts in probiotic cultures microencapsulated by spray-coating. *Food Microbiology*, 27, 1104–1111.
- Costa E., Usall J., Teixido N., Garcia N., Vinas I. (2000): Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 793–800.
- Del Razo-Rodriguez O.E., Ramirez-Bribiesca J.E., Lopez-Arellano R., Revilla-Vazquez A.L., Gonzalez-Munoz S.S., Cobos-Peralta M.A., Hernandez-Calva L.M., McDowell L.R. (2013): Effect of dietary level of selenium and grain on digestive metabolism in lambs. *Czech Journal of Animal Science*, 58, 253–261.
- FAO/WHO (2002): Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, UK/Ontario, Canada.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 59–70.
- Frizzo L.S., Soto L.P., Zbrun M.V., Bertozzi E., Sequeira G., Armesto R.R., Rosmini M.R. (2010): Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. *Animal Feed Science and Technology*, 157, 159–167.
- Frizzo L.S., Zbrun M.V., Soto L.P., Signorini M.L. (2011): Effect of probiotics on growth performance in young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Animal Feed Science and Technology*, 169, 147–156.
- Hu L., Che L., Su G., Xuan Y., Luo G., Han F., Wu Y., Tian G., Wu C., Fang Z., Lin Y., Xu S., Wu D. (2014): Inclusion of yeast-derived protein in weanling diet improves growth performance, intestinal health, and anti-oxidative capability of piglets. *Czech Journal of Animal Science*, 59, 327–336.
- Livney Y.D. (2010): Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15, 73–83.
- Maamouri O., Selmi H., M'hamdi N. (2014): Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) feed supplement on milk production and its composition in Tunisian Holstein Friesian cows. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 45, 170–174.
- Maldonado N.C., de Ruiz C.S., Otero M.C., Sesma F., Nader-Macias M.E. (2012): Lactic acid bacteria isolated from young calves – characterization and potential as probiotics. *Research in Veterinary Science*, 92, 342–349.
- Martinez F.A.C., Balciunas E.M., Converti A., Cotter P.D., Oliveira R.P.D. (2013): Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, 31, 482–488.
- Moore J. (2004): The use of probiotics in the calf: an overview. *Cattle Practice*, 12, 125–128.
- Mudgal V., Baghel R.P.S. (2010): Effect of probiotic supplementation on growth performance of pre-ruminant buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Buffalo Bulletin*, 29, 225–228.
- 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. *International Dairy Journal*, 39, 1–7.
- Qadis A.Q., Goya S., Ikuta K., Yatsu M., Kimura A., Nakaniishi S., Sato S. (2014): Effect of a bacteria-based probiotic on ruminal pH, volatile fatty acids and bacterial flora of Holstein calves. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76, 877–885.
- 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 Microbiology Reviews*, 37, 664–698.
- Rada V., Petr J. (2000): A new selective medium for the isolation of glucose nonfermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 127–132.

- Rada V., Marounek M., Rychly I., Santruckova D., Vorisek K. (1995): Effect of *Lactobacillus salivarius* administration on microflora in the crop and caeca of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 4, 161–170.
- Rochet V., Rigottier-Gois L., Ledaire A., Andrieux C., Sutren M., Rabot S., Mogenet A., Bresson J.L., Cools S., Picard C., Goupil-Feuillat N., Dore J. (2008): 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. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14, 128–136.
- Roodposhti P.M., Dabiri N. (2012): Effect of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia coli*, and immune system status in newborn female calves. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 1255–1261.
- Saxelin M., Lassig A., Karjalainen H., Tynkkynen S., Surakka A., Vapaatalo H., Jarvenpaa S., Korpela R., Mutanen M., Hatakka K. (2010): Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 293–300.
- Simon O., Jadamus A., Vahjen W. (2001): Probiotic feed additives – effectiveness and expected mode of action. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 10, 51–67.
- Soto L.P., Zbrun M.V., Frizzo L.S., Signorini M.L., Sequeira G.J., Rosmini M.R. (2014): Effect of bacterial inoculants in milk on the performance of intensively reared calves. *Animal Feed Science and Technology*, 189, 117–122.
- Timmerman H.M., Mulder L., Everts H., van Espen D.C., van der Wal E., Klaassen G., Rouwers S.M.G., Hartemink R., Rombouts F.M., Beynen A.C. (2005): Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science*, 88, 2154–2165.
- Uyeno Y., Sekiguchi Y., Tajima K., Takenaka A., Kurihara M., Kamagata Y. (2010): An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. *Anaerobe*, 16, 27–33.
- Vinderola C.G., Bailo N., Reinhemier J.A. (2000): Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97–102.
- Vlkova E., Grmanova M., Rada V., Homutova I., Dubna S. (2009): Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. *Czech Journal of Animal Science*, 54, 552–565.
- Vlkova E., Grmanova M., Killer J., Mrazek J., Kopecny J., Bunesova V., Rada V. (2010): Survival of bifidobacteria administered to calves. *Folia Microbiologica*, 55, 390–392.

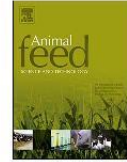
Received: 2015–01–06

Accepted after corrections: 2015–09–18

Corresponding Author

prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D., Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6-Suchdol, Czech Republic
Phone: +420 224 382 755, e-mail: vlkova@af.czu.cz

9.3 Příloha č. 3:



Selection of prebiotic oligosaccharides suitable for synbiotic use in calves



Martina Geigerová, Věra Bunešová*, Eva Vlková, Hana Salmonová, Vojtěch Rada

Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, Prague 6, 165 00, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Prebiotic
Bifidobacteria
Calf
Gastrointestinal tract

ABSTRACT

The aims of this experiment were to identify suitable commercial prebiotic substrates for bifidobacteria of calf origin and to verify *in vivo* the effects of the selected prebiotics on survival of applied and naturally occurring bifidobacteria in calf intestines. First, *in vitro* utilization of selected fructooligosaccharides, galactooligosaccharides, and inulin by *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* (two strains), *B. choerinum*, *B. thermophilum*, and *B. longum* ssp. *subsp. suis* was investigated. The highest specific growth rates were observed with Vivinal⁺ (galactooligosaccharides) and Raftilose P85 (fructooligosaccharides); therefore, these prebiotics were used for *in vivo* tests. Three groups of calves were investigated. A single dose of a probiotic mixture of five strains of rifampicin-resistant variants of bifidobacteria (RRBs) in form of fermented milk was fed to 2-days-old calves in the first experimental group (PROB). In the second group (SYNB), a single dose of probiotics was administered to calves at the same age, but a prebiotic mixture containing selected substrates was fed to the calves every day until 7 weeks of age (the end of the study). The third group, which did not receive any treatment, was used as a control. The survival of applied and naturally-occurring bifidobacteria and the numbers of selected faecal bacterial groups were determined by cultivation. Our results showed that the fed RRBs were able to survive passage through the gastrointestinal tract, with counts of more than 10⁷ CFU/g in the PROB group. Significantly higher numbers of RRBs (more than 10⁸ CFU/g) were found in the SYNB group at age 4 days. RRBs persisted in intestines for at least 49 days in both experimental groups without further significant differences. Counts of other determined bacteria were not significantly affected by the treatments. Our results showed that the selected prebiotics improve the survival of bifidobacteria passing through the digestive tract. Selected combination of pro- and prebiotics seems to be promising synbiotic in term of promoting survival of administered bacteria in intestine. However its effect on animal performance must be verified in other experiment with larger groups of animals.

1. Introduction

The intestinal microbiota is a complex community of microorganisms that performs a beneficial barrier function in young ruminants, protecting them from common enteropathogens such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., or *Campylobacter* spp. (Gaggia et al., 2010; Türkyilmaz et al., 2013). These pathogens can cause enteric diseases with diarrhoea that result in considerable economic losses for animal breeders (Chaucheyras-Durand and Durand, 2010). In the past, antibiotics have been used in animal feed to prevent

* Corresponding author.

E-mail address: bunesova@af.czu.cz (V. Bunešová).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.011>

Received 16 December 2016; Received in revised form 11 May 2017; Accepted 12 May 2017
0377-8401/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

infections with pathogenic bacteria, and, in some countries, antibiotics could serve as growth promoters (antibiotic growth promoters, AGPs) (Dibner and Richards, 2005). The use of AGPs has increased antimicrobial resistance in some bacterial species and raised concerns about the transfer of antibiotic resistance genes from animal to humans (Salisbury et al., 2002). These concerns led to a ban on the use of AGPs in the European Union, in effect since 2006. Therefore, alternatives to enhance animal defences against pathogenic or potentially pathogenic bacteria are needed. Potential alternatives include specific feed additives such as probiotics, which may modulate the gut microbiota and enhance its barrier effect. With a safe history of use, bifidobacteria and lactobacilli are considered suitable probiotics. Bifidobacteria are appropriate probiotic bacteria for dairy ruminants because they are an important part of their intestinal microbiota (Vlková et al., 2009; Kelly et al., 2016) and are more numerous in their intestinal tracts than lactobacilli (Rada et al., 2006). Some strains of bifidobacteria are host specific. Therefore, it is desirable to administer bifidobacterial species that are commonly present in the intestinal tracts of those animals. *Bifidobacterium choerinum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. longum* subsp. *suis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, and *B. thermophilum* are bifidobacteria that are naturally present in calf microbiota (Bunešová et al., 2012; Kelly et al., 2016). Bifidobacteria have been shown to have beneficial effects on their hosts (Cross, 2003; Servín, 2004). In young ruminants, administration of bifidobacteria showed positive effects on the composition of intestinal microbiota, with antimicrobial activity against *E. coli* and *Clostridium difficile* (Vlková et al., 2009; Vlková & et al., 2009; Vlkov & et al., 2010). To enhance the effect of probiotics, it is helpful to simultaneously feed prebiotics, which should be specific substrates for the probiotic bacteria and that are able to stimulate the establishment, survival and/or activity of the probiotic species, while at the same time enhancing the numbers of beneficial gastrointestinal bacterial species (Konar et al., 2016). These combined bacterial treatments are called synbiotics. Most studies on the effects of different types of prebiotics on probiotics of various origins have been performed *in vitro*, with a focus on enhancing the survival of probiotic bacteria by testing their tolerance to low pH and high concentrations of bile acids in gastrointestinal models (Michida et al., 2006; Adebola et al., 2014). The fact, whether prebiotics are able to support the long-term survival of administered probiotic bacteria in the intestine of young ruminants has not been examined *in vivo* yet. Therefore, the aim of our study was to identify commercial prebiotics that can serve as suitable substrates for calf-origin bifidobacteria and to investigate the effects of selected prebiotics on the survival of bifidobacteria administered to 2-day-old dairy calves.

2. Materials and methods

2.1. Bifidobacterial strains

The tested bifidobacteria were selected based on our previous experiments (Vlková et al., 2010; Bunešová et al., 2012). Briefly, *Bifidobacterium* strains were isolated from faecal samples of calves using modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) according to the methods of Rada and Petr (2000). Isolates were identified by 16S rRNA sequencing, and their antimicrobial activities and functional properties were examined. Five strains of bifidobacteria with suitable probiotic properties and showing long-term survival in calf intestines were selected for the present experiment. Rifampicin-resistant variants of bifidobacteria (RRBs), two strains of *B. animalis* ssp. *animalis* (strain codes 17III1 and 23II), one strain of *B. longum* ssp. *suis* (22II), one *B. choerinum* (023I2) strain, and a *B. thermophilum* (25II) strain were administered to calves in this study so that they could be distinguished from naturally occurring species of bifidobacteria.

2.2. Growth of bifidobacteria on prebiotics

Specific growth rates of bifidobacteria were determined in cultures with commercial oligosaccharides, including the fructooligosaccharides (FOSs) Raftilose P95 and Raftilose P85 (BENEO-Orafti, Tienen, Belgium), Frutafit® IQ inulin (Sensus, Roosendaal, Netherlands), and, representing galactooligosaccharides (GOSs), Vivinal® GOS syrup (FrieslandCampina Domo, Amersfoort, Netherlands). These oligosaccharides were prepared as 2% (w/v or v/v) solutions, dissolved in distilled water, and subsequently sterilized at 121 °C for 20 min. Carbohydrate-free medium (10 g/L tryptone, 10 g/L nutrient broth, 5 g/L yeast extract, 1 mL/L Tween 80, and 0.5 g/L L-cysteine) adjusted to pH 6.8 was used for an *in vitro* evaluation of the growth of bifidobacterial strains on the oligosaccharides. This medium was distributed into tubes with 9 mL each. After sterilization and cooling, the 1 mL of oligosaccharides was added to the carbohydrate-free medium as the only carbon source (0.2% v/v). Bifidobacteria were pre-cultured for 24 h at 37 °C and inoculated at 1×10^7 CFU into 10 mL of media containing the test oligosaccharides. The cultures were incubated anaerobically at 37 °C, and bacterial growth was measured turbidimetrically at 565 nm (OD_{565}) every 30 min up to 10 h and again after 24 h. At each sampling time, three replicate tubes were used to determine cell growth with the oligosaccharides. Growth curves were constructed from the data (graphs not shown), and results are presented as the specific growth rate per hour (μ).

2.3. Experimental design

The study included 15 Holstein-Friesian calves (eight female and seven male) from the Vítězslav Škoda dairy farm in Vražkov, Czech Republic, that were randomly allocated into three experimental groups with five calves per each group. In the first group (probiotic, PROB), calves were fed a single dose of probiotics. A mixture of 5 milks fermented by 5 tested RRBs (17III1, 23II, 22II, 23I2, and 25II) was prepared. Briefly: strains were pre-cultured in Wilkins-Chalgren broth (Oxoid). Overnight culture of each RRB was inoculated into 20 mL of 10% skim milk and cultivated in anaerobic conditions at 37 °C for 24 h. The number of bacteria in the fermented milk was approximately 10^8 CFU/mL as determined by cultivation. Single dose of mixed fermented milks (total volume

100 mL; 20 mL of each strain) contained approximately 10^{10} CFU was fed to 2-day-old calves. In the second group (synbiotic, SYNB), a single dose of probiotics (the same mixture as in PROB group) was administered to calves at the same age, but a prebiotic mixture containing the selected substrates was fed to the calves every day until the end of the study. The daily dose of prebiotics contained 2.5 g of Raftilose P85 and 2.5 mL of Vivinal[®]. This combination was selected based on the *in vitro* testing described in previous paragraph. The last group consisted of calves that received no treatment. Survival of the administered bifidobacteria and effects on other bacterial groups in the digestive tract were monitored by cultivation methods. Initial faecal samples were taken from 2-day-old calves before treatments, and additional samples were obtained at 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, and 49 days of age. Samples were collected in tubes directly from the rectum using sterile gloves. The tubes containing Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) and the obtained samples were immediately transferred to the laboratory.

After birth, calves were housed with their mothers for 6 h and then were housed in individual outdoor cages. They were fed colostrum for 4 days and then switched to cows milk from the stable to the end of the experiment. The milk (6–8 L) was supplied twice a day at 7 AM and at 6 PM. Water and starter feed were freely accessible. From the age 7 days, the calves were fed also by granulated feed. Starter was composed from 850 g/kg of dry matter, 200 g/kg of crude proteins and 52 g/kg of crude fibre. Granulated starter contained cereals, cereal by-products, by-products of the sugar industry, oilseed cake, vitamin and mineral supplements. Calves had no contact with other calves, and they received no antibiotics during the experiment.

2.4. Microbiological analysis

Besides enumeration of the administered RRBs, the total counts of anaerobes, bifidobacteria, lactobacilli, and *E. coli* were monitored using the plate method. The obtained faecal samples were homogenized and serially diluted in anaerobic conditions in Wilkins-Chalgren broth (Oxoid). Plates with anaerobic bacteria were incubated in anaerobic jars (Anaerobic Plus System, Oxoid) at 37 °C for 72 h, using the appropriate medium (Wilkins-Chalgren agar; Oxoid). Total bifidobacteria were enumerated on Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L; Oxoid), l-cysteine (0.5 g/L; Sigma), Tween 80 (1 mL/L; Sigma), glacial acetic acid (1 mL/L) and mupirocin (100 mg/L; Oxoid). RRB counts were determined in the same medium as bifidobacteria with the addition of rifampicin (80 mg/L; Sigma). Counts of lactobacilli were determined using Rogosa agar (Oxoid) adjusted to pH 5.4 ± 0.2 with glacial acetic acid, and plates were incubated at 37 °C for 48 h under micro-aerophilic conditions (two layers of Rogosa agar). To enumerate *E. coli*, cells were incubated aerobically on tryptone bile X-glucuronide (TBX) agar (Oxoid) at 37 °C for 24 h.

2.5. Statistical analyses

Specific growth rates were calculated according to the following equation: $\mu = (\ln x - \ln x_0)/(t - t_0)$, where x and x_0 are optical densities measured at times t and t_0 , respectively. The specific growth rate and intergroup differences determined in *in vivo* testing are presented as means \pm standard deviations. An analysis of variance (one-way ANOVA) was performed using Statistica software (Statistica 12.0, Tulsa, USA). The Shapiro-Wilk test was conducted when a significant difference was found ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Growth of bifidobacteria on oligosaccharides

Specific growth rates of the five bifidobacterial strains on galactooligosaccharides, fructooligosaccharides, and inulin were determined (Table 1). Whereas Vivinal[®] and Raftilose P85 were fermented abundantly by all test strains, Raftilose P95 and inulin were utilized by only a few strains. Two strains (*B. longum* subsp. *suis* 22II and *B. thermophilum* 25II) were able to grow on inulin, but with low specific growth rates. Strains *B. animalis* subsp. *animalis* 17III1, *B. longum* subsp. *suis* 22II, and *B. thermophilum* 25II grew faster on Raftilose P85 than on Raftilose P95 and Vivinal[®], but the difference was not significant. In contrast, strain *B. choerinum* 23I2 reached a specific growth rate of 0.83 ± 0.04 on Vivinal[®], which, compared with the growth rates of other strains, was high. The last test strain, *B. animalis* subsp. *animalis* 23II, proliferated fastest on Raftilose P85 ($\mu = 0.59 \pm 0.03$) and Vivinal[®] ($\mu = 0.59 \pm 0.01$),

Table 1
Specific growth rate per hour (μ) of bifidobacterial strains on commercial prebiotics.

Prebiotic	Bacterial species and strains				
	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 17III1	<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> 23II	<i>B. choerinum</i> 23I2	<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> 22II	<i>B. thermophilum</i> 25II
Raftilosa P95	0.39 ± 0.08^A	0.42 ± 0.07^A	NG	$0.43 \pm 0.14^{A,B}$	0.35 ± 0.07^A
Raftilosa P85	0.51 ± 0.05^A	0.59 ± 0.03^B	0.27 ± 0.01^A	0.59 ± 0.04^A	0.47 ± 0.02^A
FrutaFit [®] IQ	NG	NG	NG	0.28 ± 0.03^B	0.18 ± 0.03^B
Vivinal [®]	0.44 ± 0.09^A	0.59 ± 0.01^B	0.83 ± 0.04^B	0.54 ± 0.04^A	0.42 ± 0.06^A

Data represents means \pm standard deviation based on three replicates per bifidobacterial strain. NG: no growth.

^A Values with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

^B Values with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$).

Table 2

Counts of bacteria (log CFU/g \pm standard deviation, n = 5) in the faeces of calves fed a probiotic mixture of bifidobacteria (PROB) or probiotic mixture with prebiotics (SYNB) and of calves in an untreated group (control) at various times in the experiment.

Age (days)	Group	Total anaerobes	RRBs	Bifidobacteria	Lactobacilli	<i>Escherichia coli</i>
2	PROB	9.70 \pm 0.40 ^A	<2.00	8.67 \pm 1.04 ^A	7.35 \pm 0.94 ^A	9.11 \pm 0.16 ^A
	SYNB	9.55 \pm 0.20 ^A	<2.00	8.61 \pm 0.50 ^A	7.72 \pm 0.91 ^A	8.83 \pm 0.48 ^A
	Control	9.49 \pm 0.17 ^A	<2.00	8.01 \pm 0.63 ^A	5.89 \pm 1.20 ^A	8.89 \pm 0.78 ^A
4	PROB	9.99 \pm 0.35 ^A	7.28 \pm 0.54 ^A	9.48 \pm 0.83 ^A	7.95 \pm 0.46 ^A	8.23 \pm 0.32 ^A
	SYNB	9.74 \pm 0.08 ^A	8.42 \pm 0.77 ^B	9.54 \pm 0.25 ^A	7.43 \pm 1.06 ^A	8.00 \pm 0.37 ^A
	Control	9.89 \pm 0.56 ^A	<2.00	9.31 \pm 0.89 ^A	7.75 \pm 0.89 ^A	8.01 \pm 0.87 ^A
7	PROB	9.84 \pm 0.42 ^A	6.43 \pm 1.06 ^A	9.40 \pm 0.46 ^A	8.31 \pm 0.25 ^A	8.57 \pm 0.58 ^A
	SYNB	9.99 \pm 0.48 ^A	7.47 \pm 1.77 ^A	9.77 \pm 0.25 ^A	7.74 \pm 0.42 ^A	8.61 \pm 0.51 ^A
	Control	9.32 \pm 0.29 ^A	<2.00	8.91 \pm 0.57 ^A	7.65 \pm 0.99 ^A	7.58 \pm 0.66 ^A
10	PROB	9.83 \pm 0.42 ^A	6.32 \pm 0.85 ^A	9.29 \pm 0.47 ^A	8.48 \pm 0.78 ^A	7.85 \pm 0.87 ^A
	SYNB	9.90 \pm 0.31 ^A	7.21 \pm 0.83 ^A	9.07 \pm 0.80 ^A	7.56 \pm 0.75 ^A	7.89 \pm 0.49 ^A
	Control	9.32 \pm 0.43 ^A	< 2.00	8.52 \pm 0.32 ^A	7.49 \pm 0.84 ^A	7.98 \pm 0.97 ^A
14	PROB	9.46 \pm 0.84 ^A	6.00 \pm 0.47 ^A	8.61 \pm 0.71 ^A	8.58 \pm 0.56 ^A	7.82 \pm 0.89 ^A
	SYNB	9.57 \pm 0.06 ^A	6.21 \pm 0.98 ^A	8.64 \pm 0.47 ^A	7.65 \pm 0.75 ^{AB}	7.72 \pm 0.14 ^A
	Control	9.35 \pm 0.29 ^A	<2.00	8.62 \pm 0.45 ^A	6.93 \pm 1.13 ^B	6.52 \pm 0.86 ^A
21	PROB	9.51 \pm 0.48 ^A	5.02 \pm 1.03 ^A	8.69 \pm 0.88 ^A	7.18 \pm 0.54 ^A	7.35 \pm 0.89 ^A
	SYNB	9.78 \pm 0.31 ^A	5.58 \pm 0.95 ^A	9.24 \pm 0.49 ^A	7.29 \pm 0.64 ^A	7.13 \pm 1.74 ^A
	Control	9.35 \pm 0.33 ^A	<2.00	8.48 \pm 0.62 ^A	7.06 \pm 1.00 ^A	7.54 \pm 1.27 ^A
28	PROB	9.49 \pm 0.43 ^A	4.55 \pm 1.05 ^A	8.64 \pm 0.43 ^A	7.95 \pm 0.66 ^A	7.61 \pm 0.79 ^A
	SYNB	9.62 \pm 0.16 ^A	5.76 \pm 1.66 ^A	8.91 \pm 0.54 ^A	7.32 \pm 0.84 ^A	7.39 \pm 1.23 ^A
	Control	9.39 \pm 0.50 ^A	<2.00	8.32 \pm 0.57 ^A	7.61 \pm 0.97 ^A	6.85 \pm 1.62 ^A
35	PROB	9.40 \pm 0.55 ^A	4.20 \pm 1.58 ^A	8.21 \pm 0.65 ^A	6.99 \pm 1.58 ^A	8.32 \pm 0.99 ^A
	SYNB	9.02 \pm 0.26 ^A	4.53 \pm 0.69 ^A	8.13 \pm 0.24 ^A	7.47 \pm 0.97 ^A	7.76 \pm 1.82 ^A
	Control	9.27 \pm 0.68 ^A	<2.00	7.42 \pm 0.57 ^A	7.39 \pm 0.97 ^A	6.77 \pm 1.69 ^A
49	PROB	8.97 \pm 1.00 ^A	3.74 \pm 2.18 ^A	8.05 \pm 0.58 ^A	6.03 \pm 0.81 ^A	7.27 \pm 0.23 ^A
	SYNB	8.99 \pm 0.07 ^A	4.15 \pm 1.03 ^A	8.60 \pm 0.55 ^A	7.00 \pm 0.50 ^A	6.51 \pm 1.32 ^A
	Control	9.19 \pm 0.04 ^A	<2.00	7.82 \pm 0.93 ^A	6.84 \pm 0.03 ^A	6.15 \pm 1.34 ^A

RRBs: rifampicin resistant bacteria.

^A Values with different superscripts in the same column differ significantly (p < 0.05).

^B Values with different superscripts in the same column differ significantly (p < 0.05).

and its growth rate was significantly higher on these substrates than on Raftilose P95. Three out of five tested bifidobacteria grew best on Raftilose P85, one tested strain grew best on Vivinal[®], and one strain grew equally well on Raftilose P85 and Vivinal[®]. Based on the data obtained, Raftilose P85 with Vivinal[®] was selected as the best combination of prebiotics to administer to calves to support tested bifidobacteria.

3.2. Enumeration of administered bifidobacteria and other selected bacterial groups

The abilities of RRBs to survive in the gastrointestinal tracts (GITs) of calves and the counts of other detected bacterial groups are shown in Table 2. Our results indicate that the applied bacteria were able to survive passage through the GITs of calves. The administered bacteria were present at 7.28 \pm 0.54 log CFU/g in 4-day-old calves that were treated only with probiotics (the PROB group) and at 8.42 \pm 0.77 log CFU/g in calves of the same age in the SYNB group, these differences were significant (P < 0.05). RRBs counts slowly decreased throughout the experiment without further significant differences between both groups, with 10⁴ CFU/g by the end of the study. RRBs were not detected in faecal samples before their administration or in the control group at any point in the investigation. Administration of probiotics and synbiotics to calves did not significantly affect the counts of naturally occurring bifidobacteria (Table 2). As in the case of the RRBs, the total amount of bifidobacteria gradually decreased throughout the experiment in all three groups.

The numbers of total anaerobic bacteria were relatively stable throughout the observation period, reaching counts between 8.97 \pm 1.00 and 9.99 \pm 0.35 log CFU/g. Another investigated bacterial group were lactobacilli, which reached their maximum counts on day 14 in the PROB (8.58 \pm 0.56 log CFU/g) and SYNB (7.65 \pm 0.75 log CFU/g) groups, and on day 4 in the control group (7.75 \pm 0.89 log CFU/g). No significant differences were found between the counts of lactobacilli in the three experimental groups, except at day 14, when lactobacilli were found in significantly lower numbers in the control group than in the PROB group. Faecal *E. coli* counts showed no effect from the administration of probiotics and prebiotics. The general trend of *E. coli* populations was their gradual reduction in all monitored groups. Approximately 10⁹ CFU/g of *E. coli* were found in faeces 2 days after the birth of calves and, after 2 months of treatment, 10⁷ CFU/g of *E. coli* were detected.

4. Discussion

Bifidobacteria, like most intestinal bacteria, are saccharolytic bacteria that obtain energy and carbon through catabolism of various mono- and oligosaccharides. Several oligosaccharides have been suggested as prebiotics for calves, including mannanoli-

gosaccharides, fructooligosaccharides, cellooligosaccharides, inulin, and galactosyl-lactose (Uyeno et al., 2015). To select suitable synbiotic combinations, the substrate requirements and specificities of individual bifidobacterial strains and species should be established (Hopkins et al., 1998). Our results showed that the FOSs (Raftilosa P95 and Raftilosa P85) were good substrates for all of the strains tested, whereas inulin was not suitable for growth of calf-origin bifidobacteria. These results are in agreement with other studies, in which bifidobacteria have been shown to prefer short-chain FOSs as a substrate for growth (McKellar et al., 1993; Rossi et al., 2005). Rossi et al. (2005) also showed that, differences in fructan utilization patterns were strain specific. Vivinal[®], a GOS, was also a suitable substrate for the tested bifidobacteria. Commercially available GOSs are composed of mixtures of oligosaccharides with different degrees of polymerization and glucose contents, and their specific compositions differ by manufacture. For example, *B. animalis* ssp. *lactis*, tested in a study by Sims et al. (2014) showed more growth on Vivinal[®], which contains 24% monosaccharides, than on a GOS that contained only 3% monosaccharides. On the other hand, Hopkins et al. (1998) reported that, in many cases, higher specific growth rates were reached during cultivation of bifidobacteria on oligosaccharides, than on their monomeric constituents. Similar to the utilization of FOSs by bifidobacteria, utilization of GOSs is presumably strain specific, and the consumption of GOSs by bifidobacteria is related to the amino acid sequence of β -galactosidase (Akiyama et al., 2015).

In our experiment, the tested bifidobacteria were able to pass through upper GITs of calves in both experimental groups, which agrees with results of our previous experiments (Vlková et al., 2010; Bunešová et al., 2012). Two days after administration, the RRBs reached counts of 8.42 ± 0.77 and 7.28 ± 0.54 log CFU/g in the SYN and PROB groups, respectively. This difference in the numbers of RRBs was significant, indicating that the applied prebiotics enhanced survival of the administered bifidobacteria as they passed through the upper part of digestive tracts. This is consistent with other *in vitro* studies showing that prebiotics support the survival of probiotic bacteria during passage through simulated GIT conditions (And and Kailasapathy, 2005; Michida et al., 2006; Adebola et al., 2014). In both treatment groups (SYN and PROB), RRBs survived in GITs for at least 7 weeks and were present in faecal samples at about 10^4 CFU/g on the 49th day of life. The administered probiotics showed higher survival rates if prebiotics were also applied (the SYN group), but the differences between the SYN and PROB group were not significant, except for at the second sampling time. Overall, the total numbers of bifidobacteria were, in most cases, higher in the SYN group than in the PROB and control groups, but these differences were not significant. This finding agrees with the results of Uyeno et al. (2013), which showed that counts of bifidobacteria in the GITs of calves were non-significantly higher in groups treated with prebiotics than in control groups that were not treated with prebiotics. Apart from the possible effects of prebiotics, the bifidobacterial populations of young ruminants may also be affected by other factors such as diet (milk or a combination diet), age, use of antibiotics, or farming system (Vlková et al., 2008; Bunešová et al., 2015). Moreover, dietary supplements may have significant health promoting effects only if young animals are under stress, with studies in which calves were exposed to little stress showing no significant benefits of supplements (Abe et al., 1995). Another component of the intestinal microbiota of calves comprises lactobacilli, which have also shown beneficial effects on animal health and potential for use as probiotics (Maldonado et al., 2012). Similar to bifidobacteria, lactobacilli are able to utilize oligosaccharides such as FOSs, GOSs, inulin, and lactulose (Kneifel, 2000). Saminathan et al. (2011) examined the ability of 11 strains of lactobacilli to utilize 10 different oligosaccharides. All of the test strains were able to utilize all of the oligosaccharides, but growth varied with species, strains, and substrate. The ability of lactobacilli to utilize the commercial oligosaccharides applied in our study was not investigated *in vitro*. Therefore, it is a possible that lactobacilli could be supported by these oligosaccharides, although this was not shown in our experiment. According to our results, neither probiotics nor synbiotics affected the number of *E. coli*, but this could have been affected by the duration of our study. In comparison, Roodposhti and Dabiri (2012) found significantly lower numbers of *E. coli* in faeces of calves that received a pro/prebiotic and synbiotic, but not before 56th day.

5. Conclusions

Administered probiotics successfully passed through the upper GITs of calves in high numbers. Moreover, our newly designed combination of calf-origin bifidobacteria and commercial prebiotics (galactooligosaccharides and fructooligosaccharides) seems to be promising synbiotic in term of promoting survival and activity of administered bacteria in intestines of calves, which is one of most important prerequisite for the functionality of synbiotic product. Nevertheless, the effect of proposed synbiotic on animal performance must be verified in following experiments.

Acknowledgement

This study was supported by grant GACR 14-31984P from the Czech Science Foundation.

References

- 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.
- Akiyama, T., Kimura, K., Hatano, H., 2015. Diverse galactooligosaccharides consumption by bifidobacteria: implications of β -galactosidase—LacS operon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 664–672.
- 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.

- Bunešová, V., Domig, K.J., Killer, J., Vlková, E., Kopečný, J., Mrázek, J., Ročková, Š., Rada, V., 2012. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* 18, 166–168.
- 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. *Livest. Sci.* 178, 317–321.
- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes* 1, 3–9.
- Cross, M.L., 2003. Immune-signalling by orally-delivered probiotic bacteria: effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 17, 127–134.
- Dibner, J.J., Richards, J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 84, 634–643.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* S15–S28.
- Hopkins, M.J., Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *J. Appl. Microbiol.* 85, 381–386.
- Kelly, W.J., Cookson, A.L., Altermann, E., Lambie, S.C., Perry, R., Teh, K.H., Otter, D.E., Shapiro, N., Woyke, T., Leahy, S.C., 2016. Genomic analysis of three *Bifidobacterium* species isolated from the calf gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* 6, 30768.
- Kneifel, W., 2000. *In vitro* growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12, 27–34.
- 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.
- Maldonado, N.C., de Ruiz, C.S., Otero, M.C., Sesma, F., Nader-Macias, M.E., 2012. Lactic acid bacteria isolated from young calves – characterization and potential as probiotics. *Res. Vet. Sci.* 92, 342–349.
- McKellar, R.C., Modler, H.W., Mullin, J., 1993. Characterization of growth and inulinase production by *Bifidobacterium* spp. on fructooligosaccharides. *Bifidobact. Microflora* 12, 75–86.
- 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.
- Rada, V., Petr, J., 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J. Microbiol. Methods* 43, 127–132.
- Rada, V., Vlková, E., Nevala, J., Trojanová, I., 2006. Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 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-Australas. J. Anim. Sci.* 25, 1255–1261.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6150–6158.
- Salisbury, J.G., Nicholls, T.J., Lammerding, A.M., Turnidge, J., Nunn, M.J., 2002. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 20, 153–164.
- Saminathan, M., Siew, C.C., Kalavathy, R., Abdullah, N., Ho, Y.W., 2011. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5, 57–64.
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 405–440.
- Sims, I.M., Ryan, J.L.J., Kim, S.H., 2014. *In vitro* fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. *Anaerobe* 25, 11–17.
- Türkiylmaz, S., Eskiizmirli, S., Tunalgil, S., Bozdoğan, B., 2013. Identification, characterization and molecular epidemiology of *Escherichia coli* isolated from lamb and goat kids with diarrhoea. *Acta Vet.* 82, 357–362.
- Uyeno, Y., Kawashima, K., Hasunuma, T., Wakimoto, W., Noda, M., Nagashima, S., Akiyama, K., Tabata, M., Kushibiki, S., 2013. Effects of cellooligosaccharide or a combination of cellooligosaccharide and live *Clostridium butyricum* culture on performance and intestinal ecology in Holstein calves fed milk or milk replacer. *Livest. Sci.* 153, 88–93.
- Uyeno, Y., Shigemori, S., Shimosato, T., 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microb. Environ.* 30, 126–132.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I., Killer, J., Šmehilová, M., Molatová, Z., 2008. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Arch. Anim. Nutr.* 62, 359–365.
- Vlková, E., Grmanová, M., Rada, V., Homutová, I., Dubná, S., 2009. Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. *Czech J. Anim. Sci.* 54, 552–565.
- 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.

9.4 Příloha č. 4:

1 **Effect of dietary lupin (*Lupinus albus*) on the gastrointestinal microbiota composition in**
2 **broiler chickens and ducks**

3

4 Martina Geigerová¹, Roman Švejstl¹, Eva Skřivanová^{1,2}, Eva Straková³, Pavel Suchý⁴

5

6 ¹ *Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and*
7 *Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, Prague 6, 165*
8 *21, Czech Republic*

9 ² *Department of Nutrition Physiology and Animal Product Quality, Institute of Animal*
10 *Science, v.v.i., Pratelstvi 815, Prague-Uhrineves, 104 00, Czech Republic*

11 ³ *Department of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of*
12 *Veterinary and Pharmaceutical Science Brno, Palackeho 1946/1, 612 42 Brno, Czech*
13 *Republic*

14 ⁴ *Department of Animal Husbandry and Animal Hygiene, Faculty of Veterinary Hygiene and*
15 *Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno, Palackeho 1946/1, 612*
16 *42 Brno, Czech Republic*

17

18

19 **ABSTRACT**

20 The purpose of the study was to evaluate the amount of raffinose-series oligosaccharides
21 (RSO) in soybean meal (SBM), whole white lupin seed meal (WLM), sunflower meal (SFM),
22 and rapeseed oil meal (ROM) and to determine whether partial or complete dietary WLM
23 replacement affected the numbers of bacteria in selected groups in the microbiota of broiler
24 chickens and ducks without inducing any weight loss. Total counts of anaerobes, lactobacilli,
25 bifidobacteria, and *Escherichia coli* in caecal samples from both ducks and broiler chickens,

26 as well as in a crop chyme, in broiler chickens, were determined. Live weights before
27 slaughter were determined. Both broiler chickens and ducks were fed a control diet with SBM
28 (L₀) or diet containing 50% or 100% WLM as a substitute for SBM (groups L₅₀ and L₁₀₀,
29 respectively). In comparison with SBM, WLM contained significantly higher amounts of
30 RSO, and the amounts of oligosaccharides in SFM (1.73 ± 0.26 g/100 g) and ROM (1.79 ±
31 0.14 g/100 g) were negligible compared to that in WLM (8.26 ± 0.14 g/100 g) and SBM (6.96
32 ± 0.21 g/100 g). Inclusion of lupin in chicken diets did not significantly affect the monitored
33 bacterial groups in crop chyme, but complete replacement of SBM with WLM (L₁₀₀ group) in
34 chicken diets significantly ($P \leq 0.05$) increased the counts of lactobacilli in caecal samples.
35 Partial (L₅₀ group) and complete (L₁₀₀ group) lupin supplementation in the duck diet
36 significantly ($P \leq 0.05$) increased counts of lactobacilli and bifidobacteria by at least one
37 order of magnitude. *E. coli* counts in poultry were not affected by changes in diet. The results
38 of our study indicate that partial dietary replacement of SBM with WLM did not significantly
39 affect the live weight of broiler chickens and ducks, but that complete replacement of SBM by
40 WLM may lead to weight loss.

41

42 Keywords: broiler chickens, ducks, microbiota, white lupin, raffinose-series oligosaccharides

43

44 **Introduction**

45 From an ecological point of view, animal production and the nutrition feed required for these
46 animals, represents an undeniable environmental burden. Therefore, there is an effort,
47 especially in European countries, to select locally sourced feed ingredients, if possible. In the
48 last decade, soybeans have become the most common source of vegetable protein in
49 monogastric animal diets (Chaudhary et al., 2015; Heger et al., 2016); however, the majority
50 of soybeans are imported from overseas. In addition to reducing the need for these imports,

51 feeds based on non-genetically modified plants are currently desirable in developed countries
52 (Frewer et al., 2013). Potential alternative sources of dietary protein can be obtained from by-
53 products of vegetable oil extracted from of sunflower or rapeseed meal (Dadalt et al., 2016;
54 Liermann et al., 2016). Other protein sources include a pea protein isolate and potato or corn
55 protein concentrate (Froidmont et al., 2009; Wiltafsky et al., 2009; Dadalt et al., 2016;).
56 However, there are certain nutritional limitations, e.g., alkaloid content, trypsin inhibitors, and
57 tannins, which must be considered. Based on these requirements, low-alkaloid varieties of
58 sweet lupin (*Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*) are considered promising for use in
59 animal feed. Its advantage is that lupin can be used to completely replace soybean meal (Zralý
60 et al., 2008; Hernández and Roman, 2016). The use of lupin as an alternative source of
61 vegetable protein for the production of animal feed is increasing rapidly. There are many
62 studies analysing the impact of replacing soya with lupin in animal diets. Many authors
63 confirmed that lupin is a suitable protein component for use in animal feed, based on
64 production parameters and nutrient digestibility in animals (Zralý et al., 2008; Volek and
65 Marounek, 2009; Zdunczyk et al., 2016; Zwoliński et al., 2017). In addition to proteins,
66 important growth-promoting factors in lupin seeds include their significant amounts of
67 saccharides, including raffinose-series oligosaccharides (RSO). These oligosaccharides are
68 not digested in the upper gastrointestinal tract (GIT) of monogastric animals. Without
69 changing their structures, they pass to the intestine, where are fermented by gut microbiota to
70 produce short-chain fatty acids and gas. This can lead to flatulence and abdominal discomfort
71 (Guillon and Champ, 2002). However, RSO have been identified as prebiotic agents. In *in*
72 *vitro* studies, particularly, they have been shown to promote the growth of health-promoting
73 bacteria such as bifidobacteria and inhibit the growth of *Escherichia coli* in the gut
74 (Hernandez-Hernandez et al., 2011; Wongputtisin et al., 2015). Therefore, the aim of our
75 study was to determine the amounts of oligosaccharides in selected meals serving as a

76 potential source of protein and to assess whether inclusion of *L. albus* instead of soya in
77 broiler chicken and duck diets could induce changes in selected bacterial groups.

78 **Material and methods**

79 *Quantitative determination of raffinose series oligosaccharides in experimental meals*

80 Four meals were selected as a potential source of protein in animal nutrition including
81 soybean meal (SBM), whole white lupin seed meal (WLM), sunflower meal (SFM), and
82 rapeseed oil meal (ROM). The amount of RSO was determined using an enzymatic method
83 Megazyme Raffinose/Sucrose/Glucose Assay Kit (Megazyme International, Ireland) using α -
84 galactosidase and invertase according the manufacturer's instructions. The method does not
85 distinguish between raffinose, stachyose and verbascose; their quantities were measured as a
86 group. Three replicates were used to determine the amounts of RSO per meal.

87 *Birds and housing*

88 The study was conducted at an accredited experimental barn of the Department of Animal
89 Nutrition at University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. The protocol for this
90 study was approved by the local ethic committee.

91 In this study, a total of 240 one-day-old broiler chickens (ROSS® 308) and 180 one-day-old
92 ducks (Cherry Valley) were purchased from International Poultry Testing MTD Ústřašice,
93 Czech Republic. Animals were placed in pens with deep litter, and each experimental group
94 was maintained separately. For both types of poultry, a 23 : 1 hour light : dark lighting regime
95 was used throughout the experiment. The temperature was set at 21 – 31 °C for broiler
96 chickens and 8 – 30 °C for ducks, depending on their ages.

97 *Experimental design and diets*

98 Broiler chickens were randomly assigned to three dietary treatments (80 replicates each), and
99 every treated group was divided by sex for 40 males and 40 females. During the study period,
100 broiler chickens were fed a control diet based on SBM (L₀) or one of two diets containing

101 50% or 100% WLM as a substitute for SBM (groups L₅₀ and L₁₀₀, respectively). The chickens
102 were fed for three experimental periods over 35 days (i.e., days 1 - 14, 15 – 29, and 30 – 35).
103 The composition and calculated nutritional values of these diets are shown in Table 1.
104 Analogously, ducks were separated by dietary treatment and sex into the six groups (30 ducks
105 per group) and were fed diets containing SBM meal as a control or diets with 50% or 100%
106 WLM as a replacement for SBM (groups L₀, L₅₀ and L₁₀₀, respectively). The ducks were fed
107 for 40 days in four periods (i.e., days 1 - 10, 11 – 19, 20 – 35, and 36 – 40). The composition
108 of their diets is presented in Table 2.

109 The control feed mixture was prepared by ZZN Pelhřimov, Czech Republic, and the test feed
110 mixtures containing whole white lupin seed were prepared by MTD Ústřašice. The poultry
111 had free access to water and feed mixtures and were fed through feeder drop tubes ad libitum.
112 At the end of the experiment, the poultry were weighed. To monitor intestinal bacteria, 18
113 broiler chickens and 18 ducks (6 birds per group) from each treatment group (L₀, L₅₀ and L₁₀₀)
114 were randomly selected. Immediately after slaughter, samples from caeca from both kinds of
115 birds and crop chyme from broiler chickens were collected directly into tubes containing
116 Wilkins-Chalgren broth (Oxoid).

117 *Microbiological analysis*

118 Counts of total anaerobic bacteria, bifidobacteria, lactobacilli, and *Escherichia coli* were
119 determined by cultivation. The obtained samples were homogenized and serially diluted in
120 Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) under anaerobic conditions. Wilkins-Chalgren agar (50 g/l;
121 Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/l; Oxoid), L-cystein (0.5 g/l; Sigma), and Tween
122 80 (1 ml/l; Sigma) was used for enumeration of total anaerobic bacteria. Bifidobacteria were
123 enumerated on the same agar as total anaerobes with the addition of glacial acetic acid (1
124 ml/l) and the antibiotic mupirocin (100 mg/l; Oxoid), according to a method reported by Rada
125 and Petr (2000). These plates were incubated in anaerobic jars (Anaerobic Plus System,

126 Oxoid) at 37 °C for 72 hours. To enumerate lactobacilli, Rogosa agar (82 g/l; Oxoid) adjusted
127 to pH 5.4 ± 0.2 with glacial acetic acid was used. Lactobacilli were cultivated for 72 hours
128 under micro-aerophilic conditions using the double-layered pour-plate method. Counts of *E.*
129 *coli* were determined using TBX-agar (Oxoid), with plates incubated aerobically at 37 °C for
130 24 hours.

131 *Statistical analysis*

132 The amounts of RSO in meals, live weight, and bacteria enumeration were analysed
133 statistically using STATISTICA software (version 12.0, 2013). Amounts of RSO and
134 numbers of bacteria are presented as mean values ± standard deviations (SD). Live weights
135 are presented as mean values with pooled standard errors of the mean (SEM). A one-way
136 analysis of variance (ANOVA) was performed to determine whether values differed among
137 the treatment groups, and $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. Data were checked
138 for normality (Shapiro-Wilk test) before the statistical analysis was performed.

139

140 **Results**

141 *Amounts of RSO in experimental meals*

142 Quantities of RSO in experimental meals are shown in Table 3. The amounts of
143 oligosaccharides found in meals ranged from 1.73 to 8.26 g/100 g. Relatively low amounts of
144 RSO were found in SFM and ROM compared to those in WLM and SBM. White lupin seed
145 meal contained the highest amount of RSO among all the tested meals.

146 *Growth performance*

147 The live weights of broiler chickens and ducks were determined. The final body weights of
148 broiler chickens are shown in Table 4. No statistical differences were found in the live
149 weights of male broiler chickens fed different diets. The means of live weights of broiler
150 chickens in the L₀ group and L₅₀ group were almost identical. The average live weight of

151 female broiler chickens in the L₁₀₀ group (2.19 kg) was significantly less than that in the L₅₀
152 group (2.33 kg); but between live weights in the L₀ and L₁₀₀ groups was not found statistical
153 difference. Complete lupin replacement in duck diets also negatively affected their final body
154 weights (Table 5). Significant differences in live weights were found between the L₁₀₀ group
155 and L₅₀ group of female ducks, and between the L₁₀₀ group and L₅₀ group of male ducks, and
156 moreover between L₁₀₀ group and L₀ group of male ducks.

157 *Bacteria enumeration*

158 Counts of selected bacterial groups in caecum and crop samples collected from broiler
159 chickens are shown in Table 6. The average numbers of total anaerobic bacteria,
160 bifidobacteria, lactobacilli and *E. coli* isolated from crop chyme in all three experimental
161 groups were not significantly different. The amount of lupin in diets did not affect the number
162 of these bacteria. Although statistically significant differences were not found, counts of
163 bifidobacteria and lactobacilli were the highest in the group in which soya was completely
164 replaced with lupin. Conversely, in the same group (L₁₀₀), the counts of *E.coli* were the
165 lowest. In the caeca of broiler chickens, lactobacilli counts were significantly higher in the
166 L₁₀₀ group than in the L₅₀ and L₀ groups. This is the only statistically significant difference
167 that was found in the faecal microbiota of broiler chickens. The highest counts of
168 bifidobacteria as well as *E. coli* were detected in the L₅₀ group.

169 Considerably higher bacterial diversity was observed in the faecal microbiota of ducks than
170 that of chickens (Table 7). Bifidobacteria and lactobacilli counts were significantly higher in
171 both experimental groups in which soya was replaced by lupin (L₅₀ and L₁₀₀), as compared to
172 the control (L₀) group. The numbers of bifidobacteria in the L₅₀ and L₁₀₀ groups were higher
173 by at least one order of magnitude. The number of lactobacilli in the L₅₀ group was higher by
174 two orders of magnitude. No statistically significant differences were found among counts of

175 total anaerobic bacteria, and the amounts of *E. coli* were approximately equal in all three
176 groups.

177

178 **Discussion**

179 Members of the raffinose family of oligosaccharides are present in various plant sources
180 (Andersen et al., 2005). High amounts of RSOs are mainly found in legumes, and their levels
181 in seeds vary by species and based on environmental factors (Martínez-Villaluenga et al.,
182 2005). Generally, all lupin species are good sources of RSOs and can be used for the isolation
183 of oligosaccharides. According to Martínez-Villaluenga et al. (2005), white lupin seeds
184 contain RSO amounts ranging from 5.46% to 8.51% dry matter (DM). In our experiment,
185 WLM contained comparatively high levels of RSO (8.26 ± 0.14 g/100 g). High amounts of
186 RSOs were also found in SBM, but these levels were lower than those in lupin, which
187 corroborates the findings of other authors (Kumar et al., 2010; Švejtil et al., 2015).
188 According to Zdunczyk et al. (2014), the inclusion of blue lupin seeds as 20% of a layer diet
189 can increase the RSO content, from 0.77% to 2.08% DM. The amount of oligosaccharides in
190 SFM and ROM was similar, and RSO contents in these meals were negligible compared to
191 those with WLM and SBM.

192 The commensal microbial community plays a major role in poultry health and digestion and
193 its composition can be influenced by diet. Currently, there is limited information available in
194 the literature on whether crop microbial composition can be affected by feed. The crop is the
195 first major defence against pathogens in broiler chickens. One of the crop's barriers against
196 pathogens is an acidic pH. A lower pH can be promoted by lactic acid fermentation performed
197 by lactobacilli. Lactobacilli are the dominant bacterial group in the crops of broiler chickens
198 (Kierończyk et al., 2016), as shown also in our results. The numbers of lactobacilli in crops
199 were similar to the numbers of total anaerobic bacteria in all three groups (L_0 , L_{50} , and L_{100}).

200 Besides lactobacilli, among the health-promoting bacteria belong bifidobacteria. In our study,
201 bifidobacteria were found at approximately 10^6 CFU/g in poultry crops, which was an order
202 of magnitude less than described by Petr and Rada (2001). The highest numbers of lactobacilli
203 and bifidobacteria were found in the L₁₀₀ group, relative to those in the L₅₀ and L₀ groups, but
204 these differences were not significant. *E. coli* counts in the crops of broiler chickens were not
205 affected by diet. Undigested oligosaccharides in the upper part of the GIT are fermented in the
206 intestines of birds by the gut microbiota (Patterson and Burkholder, 2003). The presence of
207 RSO in diets may result in increased numbers of bacteria in certain populations (Józefiak et
208 al., 2004). Higher counts of total anaerobes in the caeca of broiler chickens and ducks were
209 found in the L₁₀₀ group, relative to that in the L₀ group. However, these differences were not
210 significant because both diets contained some RSO. Dietary RSO has been shown to increase
211 numbers of lactic acid bacteria, as well as increase visible bacteria attached to cell walls in the
212 caecum (Lan et al., 2007). Complete replacement of SBM with WLM in the diets of broiler
213 chickens affected the numbers of lactobacilli in caeca samples; however, the other
214 investigated bacterial groups were not affected. Similarly, differences in the composition of
215 duck diets positively affected lactobacilli and bifidobacteria counts. The inclusion of whole
216 white lupin seeds in the experimental diets caused appropriate changes in the amounts of
217 probiotic bacteria. Increased numbers of bifidobacteria and lactobacilli can have a positive
218 effect on poultry by regulating the intestinal microbial balance (Buclaw, 2016). Similar results
219 were described by Zdunczyk et al. (2014), who observed increased counts of bifidobacteria
220 and lactobacilli in laying hens fed a diet supplemented with 20% blue lupin seeds. In contrast,
221 the addition of yellow lupin seed meal to the feed of turkeys did not increase the numbers of
222 lactobacilli (Zdunczyk et al., 2016). *E. coli* is a common intestinal bacterium, and most of
223 strains are commensal; however, some strains can cause disease. The counts of *E. coli* in

224 faecal samples of both types of poultry were not affected by differences in the composition of
225 diets.

226 In addition to monitoring quantitative changes in selected bacterial groups, final body weights
227 were determined. As suggested in the introduction, replacement of SBM with lupin meal in
228 the diets of various monogastric animals, including rabbits, turkeys, chickens, and pigs, does
229 not necessarily reduce weight gain (Wu et al., 2004; Zralý et al., 2008; Volek and Marounek,
230 2009; Zdunczyk et al., 2016). However, there have been some reports of weight loss with this
231 replacement (Olkowski et al., 2005; Smulikowska et al., 2014). Our results showed that
232 partial inclusion of lupin in diets did not significantly affect the body weights of broiler
233 chickens or ducks, but that complete replacement of SBM with WLM reduced their live
234 weights.

235

236 **Conclusions**

237 The present study shows that WLM contains higher levels of RSO than SBM, and
238 supplementation of diets had a positive influence on the intestinal microbiota composition of
239 broiler chickens and ducks. Partial and complete replacement of SBM with lupin in duck diets
240 significantly increased counts of lactobacilli and bifidobacteria. Further, a significant increase
241 in the numbers of lactobacilli in broiler chicken caecum was observed only when SBM was
242 fully replaced with WLM. The obtained data showed that a diet containing 50% whole white
243 lupin had a positive effect on the composition of the intestinal microbiota in ducks, and that
244 this addition had neither negative nor positive effects on the live weights of ducks and broiler
245 chickens.

246

247 **Acknowledgements**

248 This study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No.
249 NAZV QJ1510136).

250

251 **References**

252 Andersen K.E., Bjerregaard C., Møller P., Sørensen J.C., Sørensen H. (2005): Compositional
253 Variations for α -Galactosides in Different Species of Leguminosae, Brassicaceae, and
254 Barley: A Chemotaxonomic Study Based on Chemometrics and High-Performance
255 Capillary Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5809–5817.

256 Buclaw M. (2016): The use of inulin in poultry feeding: a review. *Journal of Animal
257 Physiology and Animal Nutrition*, 100, 1015–1022.

258 Dadalt J.C., E. Velayudhan D., Neto M.A.T., Slominski B.A., Nyachoti C.M. (2016): Ileal
259 amino acid digestibility in high protein sunflower meal and pea protein isolate fed to
260 growing pigs with or without multi-carbohydrase supplementation. *Animal Feed Science
261 and Technology*, 221, 62–69.

262 Frewer L.J., van der Lans I.A., Fischer A.R.H., Reinders M.J., Menozzi D., Zhang X., van
263 den Berg I., Zimmermann K.L. (2013): Public perceptions of agri-food applications of
264 genetic modification – A systematic review and meta-analysis. *Trends in Food Science
265 & Technology*, 30, 142–152.

266 Froidmont E., Wathelet B., Oger R., Romnée J.M., Colinet A., Cloet D., Didelez M., Pichon
267 J.C., Boudry C., Jean G., Bartiaux-Thill N. (2009): Nutritional properties of potato
268 protein concentrate compared with soybean meal as the main protein source in feed for
269 the double-muscled Belgian Blue bull. *Animal* 3, 200–208.

270 Guillon F., Champ M.M.-J. (2002): Carbohydrate fractions of legumes: uses in human
271 nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 3, S293–S306.

- 272 Heger J., Wiltafsky M., Zelenka J. (2016): Impact of different processing of full-fat soybeans
273 on broiler performance. *Czech Journal of Animal Science*, 61, 57–66.
- 274 Hernandez-Hernandez O., Côté G.L., Kolida S., Rastall R.A., Sanz M.L. (2011): In vitro
275 fermentation of alternansucrase raffinose-derived oligosaccharides by human gut
276 bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10901–10906.
- 277 Hernández A.J., Roman D. (2016): Phosphorus and nitrogen utilization efficiency in rainbow
278 trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with lupin (*Lupinus albus*) or soybean (*Glycine*
279 *max*) meals as partial replacements to fish meal. *Czech Journal of Animal Science*, 61,
280 67–74.
- 281 Chaudhary J., Patil G.B., Sonah H., Deshmukh R.K., Vuong T.D., Valliyodan B., Nguyen
282 H.T. (2015): Expanding omics resources for improvement of soybean seed composition
283 traits. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1021.
- 284 Józefiak D., Rutkowski A., Martin S. (2004): Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a
285 review. *Animal Feed Science and Technology*, 113, 1–15.
- 286 Kierończyk B., Rawski M., Długosz J., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2016): Avian crop
287 function – A review. *Annals of Animal Science*, 16, 653–678.
- 288 Kumar V., Rani A., Goyal L., Dixit A.K., Manjaya J.G., Dev J., Swamy M. (2010): Sucrose
289 and raffinose family oligosaccharides (RFOs) in soybean seeds as influenced by
290 genotype and growing location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5081–
291 5085.
- 292 Lan Y., Williams B.A., Verstegen M.W.A., Patterson R., Tamminga S. (2007): Soy
293 oligosaccharides in vitro fermentation characteristics and its effect on caecal
294 microorganisms of young broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 133,

295 286–297.

296 Liermann W., Berk A., Bösch V., Dänicke S. (2016): Effects of diets differing in protein
297 source and technical treatment on digestibility, performance and visceral and
298 biochemical parameters of fattening pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 70, 190–208.

299 Martínez-Villaluenga C., Frías J., Vidal-Valverde C. (2005): Raffinose family
300 oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. *Food Chemistry*, 91,
301 645–649.

302 Olkowski B.I., Classen H.L., Wojnarowicz C., Olkowski A.A. (2005): Feeding high levels of
303 lupine seeds to broiler chickens: plasma micronutrient status in the context of digesta
304 viscosity and morphometric and ultrastructural changes in the gastrointestinal tract.
305 *Poultry Science*, 84, 1707–1715.

306 Patterson J., Burkholder K. (2003): Application of prebiotics and probiotics in poultry
307 production. *Poultry Science*, 82, 627–631.

308 Petr J., Rada V. (2001): Bifidobacteria are obligate inhabitants of the crop of adult laying
309 hens. *Journal of Veterinary Medicine*, 48, 227–33.

310 Rada V., Petr J. (2000): A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting
311 bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 127–132.

312 Smulikowska S., Konieczka P., Czerwinski J., Mieczkowska A., Jankowiak J. (2014):
313 Feeding broiler chickens with practical diets containing lupin seeds (*L. angustifolius* or
314 *L. luteus*): effects of incorporation level and mannanase supplementation on growth
315 performance, digesta viscosity, microbial fermentation and gut morphology. *Journal of*
316 *Animal and Feed Sciences*, 23, 64–72.

- 317 Švejtil R., Musilová Š., Rada V. (2015): Raffinose-Series oligosaccharides in soybean
318 products. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 46, 73–77.
- 319 Volek Z., Marounek M. (2009): Whole white lupin (*Lupinus albus* cv. Amiga) seeds as a
320 source of protein for growing-fattening rabbits. *Animal Feed Science and Technology*,
321 152, 322–329.
- 322 Wiltafsky M.K., Bartelt J., Relandeau C., Roth F.X. (2009): Estimation of the optimum ratio
323 of standardized ileal digestible isoleucine to lysine for eight- to twenty-five-kilogram
324 pigs in diets containing spray-dried blood cells or corn gluten feed as a protein source.
325 *Journal of Animal Science*, 87, 2554–2564.
- 326 Wongputtisai P., Ramaraj R., Unpaprom Y., Kawaree R., Pongtrakul N. (2015): Raffinose
327 family oligosaccharides in seed of *Glycine max* cv. Chiang Mai60 and potential source of
328 prebiotic substances. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 1750–
329 1756.
- 330 Wu Y.B., Ravindran V., Thomas D.G., Birtles M.J., Hendriks W.H. (2004): Influence of
331 method of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance,
332 apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology of
333 broilers. *British Poultry Science*, 45, 385–394.
- 334 Zdunczyk Z., Jankowski J., Rutkowski A., Sosnowska E., Drazbo A., Zdunczyk P.,
335 Juskiewicz J. (2014): The composition and enzymatic activity of gut microbiota in laying
336 hens fed diets supplemented with blue lupine seeds. *Animal Feed Science and
337 Technology*, 191, 57–66.
- 338 Zdunczyk Z., Krawczyk M., Mikulski D., Jankowski J., Przybylska-Gornowicz B.,
339 Juskiewicz J. (2016): Beneficial effects of increasing dietary levels of yellow lupine

340 (Lupinus luteus) seed meal on productivity parameters and gastrointestinal tract
341 physiology in eight-week-old turkeys. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 189–
342 198.

343 Zralý Z., Písaříková B., Trčková M., Doležal M., Thiemel J., Simeonovová J., Juzl M. (2008):
344 Replacement of soya in pig diets with white lupine cv. Butan. *Czech Journal of Animal*
345 *Science*. 53, 418–430.

346 Zwoliński C., Gugolek A., Strychalski J., Kowalska D., Chwastowska-Siwiecka I.,
347 Konstantynowicz M. (2017): The effect of substitution of soybean meal with a mixture
348 of rapeseed meal, white lupin grain, and pea grain on performance indicators, nutrient
349 digestibility, and nitrogen retention in Popielno White rabbits. *Journal of Applied*
350 *Animal Research*, 45, 570–576.

351

352

353

354 *Corresponding author:*

355 doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.

356 tel.: +420 22438 2678, e-mail: skrivanovae@af.czu.cz

357

Table 1. Selected nutrients of experimental diets (g/kg, dry matter) for broiler chickens containing different amount of whole white lupine seeds.

Nutrition value	1 - 14 days			15 - 29 days			30 - 35 days		
	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀
Crude protein	254.5	265.1	248.7	226.9	217.3	223.3	205.1	215.5	203.6
Fat	63.9	57.7	60.5	66.4	68.1	69.8	81.4	66.5	80.9
Crude fibre	24.3	35.1	52.3	24.9	49.4	57.5	36.3	35.9	45.2

Table 2. Selected nutrients of experimental diets (g/kg, dry matter) for ducks containing different amount of whole white lupine seeds.

Nutrition value	1 - 10 days			11 - 19 days			20 - 35 days			36 - days		
	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀
Crude protein	238.2	247.9	265.8	213.7	214.5	229.8	180.1	182.8	175.8	178.7	170.4	180.9
Fat	39.5	42.9	57.7	37.9	44.5	55.5	37.6	43.0	52.4	43.3	46.3	49.4
Crude fibre	26.1	48.3	53.3	30.3	38.0	63.5	31.4	39.3	46.1	36.1	35.1	37.7

Table 3. The amount of raffinose series oligosaccharides (g/100 g) in soybean meal (SBM), whole white lupine seed meal (WLM), sunflower meal (SFM) and rapeseed oil meal (ROM).

Meal	Amount of RSO
SBM	6.96 ± 0.21 ^A
WLM	8.26 ± 0.14 ^B
SFM	1.73 ± 0.26 ^C
ROM	1.79 ± 0.14 ^C

Means with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 4. Live weight (kg) before slaughter of broiler chickens fed by diets based on soybean meal and/or whole white lupine seed meal.

	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀	SEM
male	2.53 ^A	2.55 ^A	2.46 ^A	0.32
female	2.30 ^{AB}	2.33 ^A	2.19 ^B	0.23

L₀ – diet with SBM

L₅₀ – diet containing 50 % of WLM as a substitute for SBM

L₁₀₀ – diet with WLM

Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 5. Live weight (kg) before slaughter of ducks fed by diets based on soybean meal and/or whole white lupine seed meal.

	L ₀	L ₅₀	L ₁₀₀	SEM
male	3.26 ^A	3.14 ^A	2.94 ^B	0.31
female	3.11 ^{AB}	3.19 ^A	2.98 ^B	0.25

L₀ – diet with SBM

L₅₀ – diet containing 50 % of WLM as a substitute for SBM

L₁₀₀ – diet with WLM

Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 6. Bacterial counts (log CFU/g \pm SD, n = 6) in caecal samples and crop chyme of broiler chickens fed with diets based on different amounts of WLM.

	Total anaerobes	Bifidobacteria	Lactobacilli	<i>E. coli</i>
Caecum				
L ₀	9.33 \pm 0.38 ^A	8.34 \pm 1.34 ^A	8.76 \pm 0.68 ^A	7.99 \pm 0.39 ^A
L ₅₀	9.56 \pm 0.27 ^A	9.14 \pm 0.27 ^A	8.21 \pm 0.68 ^A	8.57 \pm 0.65 ^A
L ₁₀₀	9.77 \pm 0.29 ^A	8.95 \pm 0.46 ^A	9.55 \pm 0.49 ^B	8.22 \pm 0.23 ^A
Crop				
L ₀	8.72 \pm 0.54 ^A	5.66 \pm 0.37 ^A	8.28 \pm 0.51 ^A	6.20 \pm 1.14 ^A
L ₅₀	8.31 \pm 0.54 ^A	5.42 \pm 0.56 ^A	8.04 \pm 0.69 ^A	6.29 \pm 1.38 ^A
L ₁₀₀	9.21 \pm 0.56 ^A	6.29 \pm 1.24 ^A	8.93 \pm 0.69 ^A	5.44 \pm 0.50 ^A

L₀ – diet with SBM

L₅₀ – diet containing 50 % of WLM as a substitute for SBM

L₁₀₀ – diet with WLM

Means with different superscripts in columns from the same type of the sample are significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 7. Bacterial counts (log CFU/g \pm SD, n = 6) in caecal samples of ducks fed with diets based on different amounts of WLM.

	Total anaerobes	Bifidobacteria	Lactobacilli	<i>E. coli</i>
Caecum				
L ₀	9.54 \pm 0.45 ^A	6.93 \pm 0.74 ^A	4.53 \pm 0.40 ^A	7.21 \pm 0.29 ^A
L ₅₀	9.96 \pm 0.42 ^A	8.55 \pm 0.44 ^B	6.55 \pm 0.98 ^B	6.97 \pm 0.86 ^A
L ₁₀₀	9.93 \pm 0.32 ^A	8.15 \pm 0.53 ^B	6.06 \pm 0.46 ^B	7.13 \pm 0.28 ^A

L₀ – diet with SBM

L₅₀ – diet containing 50 % of WLM as a substitute for SBM

L₁₀₀ – diet with WLM

Means with different superscripts in columns are significantly different ($P \leq 0.05$).

9.5 Příloha č. 5:

Hospodářská zvířata

Bifidobakterie jako možná probiotika pro mláďata přežvýkavců

V. BUNEŠOVÁ, M. GEIGEROVÁ, E. VLKOVÁ

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

SOUHRN

Bunešová V., Geigerová M., Vlková E. **Bifidobakterie jako možná probiotika pro mláďata přežvýkavců.** Veterinářství 2015;65:528-532.

Rovnováha intestinální mikrobioty telat může být ovlivněna způsobem odchovu, krměním, stresovými situacemi a také podáváním antibiotik. Průjmová onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí telat, a to především v prvních dnech života. Modulační střevní mikrobioty krmnými aditivami, jako jsou probiotika, je velice aktuálním tématem, jež nabízí celou řadu možností. Rod *Bifidobacterium* patří mezi nejčastěji používané probiotické bakterie u lidí. Zájem o využití bifidobakterií ve výživě hospodářských zvířat je zatím spíše okrajový, i když jsou bifidobakterie běžnou součástí zdravé střevní mikrobioty mláďat přežvýkavců a lze u nich očekávat stejný pozitivní efekt na zdravotní stav hostitele, jako je tomu u lidí. Mezi nejvýznamnější výhody bifidobakterií patří modulační obranné odpovědi hostitele a ochrana proti infekčním chorobám. Bifidobakterie mohou produkovat různé antimikrobiální látky, jako organické kyseliny nebo bakteriociny, mají schopnost posilovat slizniční imunitu, čímž potlačují potenciální patogeny a přispívají k celkovému zlepšení zdravotního stavu hostitele.

SUMMARY

Bunešová V., Geigerová M., Vlková E. **Bifidobacteria as possible probiotics for young ruminants.** Veterinářství 2015;65:528-532.

The balance of the intestinal ecosystem of calves can be affected by the farming system, feeding, and stressful situations and by antibiotics. Diarrheal diseases the main cause of calf deaths, with mortality rates higher in the first four weeks of life, is related with economic losses. Bacteria of the genus *Bifidobacterium* belong to the most commonly used probiotic bacteria. Interest in the use of bifidobacteria in livestock nutrition is still rather marginal, although bifidobacteria are normal part of healthy intestinal microbiota of young ruminants and positive effect on the health of the host can be expected as in case of humans. The modulation of the gut microbiota with feed additives, such as probiotics, towards host-protecting functions to support animal health, is a topical issue in animal breeding and creates fascinating possibilities. Among the most distinctive benefits of bifidobacteria are modulation of host immune responses and protection against infectious diseases. Bifidobacteria can produce various antimicrobial compounds, such as organic acids and bacteriocins, have the ability to strengthen mucosal immunity, which inhibit potential pathogens and contributes to the overall improvement of health condition of the host.

Mikrobiota trávicího traktu

Mikrobiotu v gastrointestinálním traktu (GIT) savců lze považovat za aktivní orgán s širokou druhovou biodiverzitou, kdy počet buněk dosahuje hodnoty až 10^{14} . Z trávicího traktu bylo izolováno více než 500 různých druhů mikroorganismů, skutečný počet je však mnohem vyšší, což je potvrzováno při molekulárně-biologických analýzách gastrointestinální mikrobioty. Mikrobiota GIT hraje

důležitou roli v utváření celkového zdraví jedince a je prospěšná pro hostitele. Bakterie se rozdělují na jednoznačně pozitivní a ty, které mohou způsobovat problémy při přemnožení, jako například klostridie, patogenní kmeny *E. coli* a další. Mikrobiální diverzita a funkce trávicího traktu hospodářských zvířat je pak ovlivněna mnoha endogenními a exogenními faktory.

Vývoj mikrobioty trávicího traktu mláďat během prvních týdnů života je jedním z nejdůležitějších

faktorů ovlivňujících zdraví jedince. Střevní mikrobiota mláďat přežvýkavců se stejně jako u jiných druhů savců začíná utvářet již během porodu. Přirozená mikrobiota matky a mikroorganismy z prostředí jsou hlavní kontaminanty infikující trávicí trakt mláďate. V prvních dnech po narození tvoří intestinální mikrobiotu lidí, kuřat, selat a telat téměř výhradně koliformní bakterie, bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení. Vysoké počty bifidobakterií jsou typické především pro savce v období mléčné výživy.^{3,4} Po odstavení se vyvíjí finální dospělá mikrobiota.

Savci se podle anatomie a fyziologie trávicího traktu dělí na monogastrická a polygastrická zvířata a složení jejich mikrobioty se liší. Hlavní mikrobiální skupiny v tlustém střevě u monogastrických zvířat (jako je prase, drůbež, králík) jsou rody *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* a bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. U polygastrických zvířat, jako jsou krávy a ovce, je hlavním místem mikrobiálního metabolismu bacher, kde převažují vlákninu degradující rody, jako jsou *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* a *Bacteroides* spolu s dalšími významnými skupinami, jako je například rod *Prevotella*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Megasphaera*. Dále pak některé anaerobní houby, brvíti prvoci a v bacheru jsou hojně zastoupeny také metanogenní organismy.^{5,6,7}

Nerovnováha střevní mikrobioty a patogeny

Za normálních okolností jsou přítomné komenzální bakterie základním aktivem pro zdraví, a mají nutriční a ochrannou funkci pro střevní strukturu a homeostázu. Fyziologické a psychologické stresory vedou k dysfunkci střevní bariéry, která může mít za následek zvýšení střevní propustnosti, rovněž mají vliv na složení střevní mikrobioty a zvyšují citlivost na enterální patogeny.^{8,9} Snížení výskytu gastrointestinálních infekcí u mláďat přežvýkavců je velmi důležité, protože infekce zpomaluje jejich vývoj, a tím negativně ovlivňuje následnou produkci.¹⁰ V podmínkách velkochovu jsou často telata odebrána od matek v krátké době po narození a může tak být narušený přirozený vývoj intestinální mikrobioty.² Díky tomu se mohou zvyšovat počty bakterií, jako jsou klostridie a *E. coli*, což vede ke vzniku průjemových onemocnění v chovech přežvýkavců.¹¹ Infekční průjemová onemocnění jsou navíc jednou z hlavních příčin ekonomických ztrát v důsledku mortality. Úmrtnost telat v prvních 16 týdnech života se obvykle pohybuje mezi 8 a 12 %, toto rozmezí hodnot platí pro mírné klimatické podmínky a liší se mezi stády.¹² Střevní infekce u mláďat hospodářských zvířat jsou nejčastěji způsobeny *Escherichia coli*, rotaviry, koronaviry, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp. a *Cryptosporidium* sp. Skot představuje hlavní rezervoár patogenních *E. coli*, tyto patogeny se nacházejí také u ovcí, koz a divokých přežvýkavců. Infekce způsobená *E. coli* O157:H7 je obvykle u dospělých přežvýkavců asymptomatická, ale někdy způsobuje průjem u mláďat telat.¹³ Dalšími důležitými patogeny vyskytujícími se u mláďat přežvýkavců jsou *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, které běžně kolonizují trávicí trakt bez jakýchkoliv příznaků. Některé studie však uvádějí, že *Campylobacter* sp. může být přenesen do potravinového řetězce.¹⁴

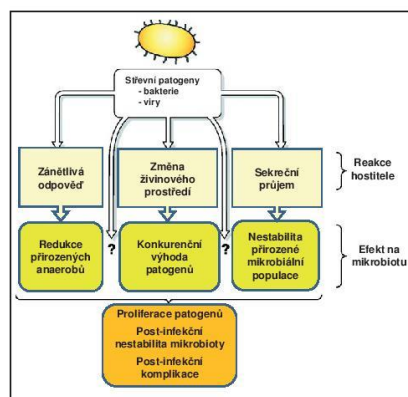


Schéma 1 – Výsledek interakce mezi patogenem, hostitelem a jeho střevní mikrobiotou¹⁵

Na schématu 1 je zobrazen výsledek interakce mezi patogenem, hostitelem a střevní mikrobiotou.¹⁵ Střevní patogeny využívají vlastní faktory virulence k navození hostitelské odpovědi, což narušuje přirozenou mikrobiotu a nepříznivě ovlivňuje jak ochranné, tak imunomodulační funkce. V důsledku toho je patogen schopný proliferace a může tak negativně ovlivnit mikrobiotu hostitele, což může mít za následek mikrobiální nestabilitu po infekci a postinfekční komplikaci. Navíc jsou mechanismy působení některých patogenů na střevní mikrobiotu stále neobjasněné.

Podávání probiotických bakterií podporuje vytvoření stabilní a vyvážené střevní mikrobioty, kdy dochází k podpoření zdraví telat a eliminaci použití antibiotik k léčbě.^{2,16}

Eliminace antibiotik ze živočišné produkce

Cílem živočišné produkce je především dodávka bezpečných potravin určených k lidské spotřebě s přihlédnutím k dobrým životním podmínkám zvířat a ohledem na šetrnost k životnímu prostředí. Důležitou oblastí zootecnického a mikrobiologického výzkumu je zlepšení kvality a bezpečnosti masa. Je velice dobře známo, že patogeny, jako jsou *Campylobacter* a *Salmonella*, mohou být přenášeny v potravinovém řetězci, a tudíž mohou být zdrojem lidského onemocnění.¹⁶ V minulosti byla antibiotika zahrnuta do krmiv

Tab. 1 – Očekávané vlastnosti a bezpečnostní kritéria pro probiotika¹⁶

✓ Netoxické a nepatogenní
✓ Přesná taxonomická charakterizace a identifikace
✓ Mikroorganismus přirozeně se vyskytující u cílového hostitele
✓ Přežívání, kolonizace a metabolická aktivita v trávicím traktu hostitele, kdy je vyžadována:
✓ Odolnost vůči žaludečním šťávám a žluči
✓ Perzistence v gastrointestinálním traktu
✓ Adheze na střevní epitel a hlen
✓ Kompetice s rezidentní mikrobiotou
✓ Produkce antimikrobiálních látek
✓ Antagonismus vůči patogenním organismům
✓ Modulační imunitní odpovědi
✓ Genetická stabilita
✓ Schopnost vyvinout alespoň jednu zdraví prospěšnou vědecky podpořenou vlastnost
✓ Poddávnost a stabilita kmene během zpracování, skladování a aplikace
✓ Životaschopnost ve vysokých počtech
✓ Žádoucí organoleptické a technologické vlastnosti

pro zvířata v subterapeutických hladinách jako růstové stimulanty.¹⁷ V roce 2006 byl v Evropské unii vydán zákaz používání antibiotik ke krmným účelům. Antibiotika se tedy v současnosti používají pouze k léčbě, ale i tak je snaha o omezení jejich použití z důvodu jejich šíření do životního prostředí a vznikající rezistence patogenních mikroorganismů.¹⁸ Hledají se proto nové cesty pozitivního ovlivnění složení střevní mikrobioty a celkového zdravotního stavu zvířat, což vede k celkovému zefektivnění chovu hospodářských zvířat.

Jak již bylo zmíněno, účelem antibiotik byla prevence infekčních onemocnění a úprava složení mikrobioty gastrointestinálního traktu, čímž se docílilo lepšího využití krmiva a zvýšení přírůstků. Tyto okolnosti zvýšily zájem o využití probiotik ve výživě hospodářských zvířat, které by tak preventivně působily proti střevním infekcím a podporovaly zdraví mláďat přežvýkavců. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos.¹⁹ Vhodné je probiotika zahrnout do krmné dávky ve stresujících obdobích, jako je doba odstavy, začátek laktace nebo změna složení krmné dávky.²⁰ Podávání probiotických bakterií hospodářským zvířatům může pomoci zvýšit hmotnostní přírůstek a zlepšit konverzi krmiva.²¹ Frizzo et al. publikovali, že telata krmená probiotiky lépe využívala krmivo ve srovnání s telaty, která přijímala krmivo bez probiotik.⁸

Mezi bakterie, které se běžně používají v Evropské unii jako krmná aditiva, patří především gram pozitivní bakterie rodu *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a některé kvasinky rodu *Saccharomyces* a *Kluyveromyces*.²² V posledních letech vzrostl zájem o uplatnění bakterií rodu *Bifidobacterium* ve výživě zvířat.

Kritéria a požadavky pro probiotické mikroorganismy

Probiotika by se měla do místa svého účinku dostat v dostatečných počtech a být životaschopná. Pro testování probiotických vlastností se používá řada *in vitro* testů a následně *in vivo* studií.²³ Během jejich selekce je třeba zohlednit celou řadu aspektů, které ovlivňují jejich účinnost (Tabulka 1).

Také je třeba brát v úvahu, že probiotické vlastnosti jsou druhově anebo kmenově specifické.²⁴ Mechanismus jejich účinku je rozmanitý v závislosti na použitém mikroorganismu a je také ovlivněn fyziologickým stavem a stářím hostitele. Počáteční kolonizace je vhodným okamžikem, kdy lze modulovat budoucí střevní mikrobiotu.²⁵ Podle Hill et al. lze vlastnosti a mechanismy účinku probiotik dělit do tří skupin s ohledem na četnost jejich výskytu u jednotlivých probiotických kmenů (Schéma 2).¹⁹ Některé probiotické účinky lze zobecnit na všechny kmény či druhy laktobacilů a bifidobakterií, které jsou považovány za jednoznačně pozitivní mikroorganismy. Mezi takové vlastnosti patří například produkce organických kyselin. Jedná se o primární metabolity vznikající při rozkladu cukrů těmito bakteriemi, proto je to vlastnost, která se uplatňuje vždy, když jsou tyto bakterie přítomny a jsou metabolicky aktivní. Mnoho probiotických vlastností bývá druhově specifických a některé vlastnosti jsou nalezeny jen u vybraných kmenů, v tom případě se jedná o kmenově specifickou vlastnost (schéma 2).

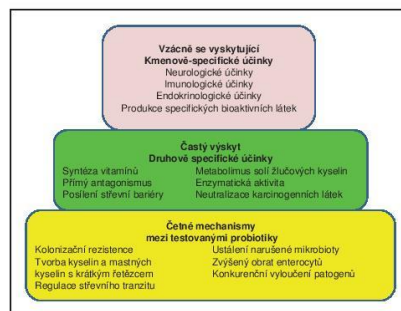


Schéma 2 – Vlastnosti a mechanismy účinku probiotik¹⁹

Probiotické bakterie by měly být schopny adhezovat na střevní epitel hostitele, vykazovat antagonistické účinky vůči patogenním a potenciálně patogenním mikroorganismům a měly by celkově pozitivně ovlivňovat zdraví hostitele.²⁶ Pro zvýšení pravděpodobnosti kolonizace je doporučeno použít kmen původně izolovaný z trávicího traktu druhu zvířete, pro který jsou daná probiotika určena. Efektivnější je podávání vícekmenných probiotik, která pínášejí vyšší efektivitu díky synergickému účinku jednotlivých kmenů.²¹

Bifidobakterie jako probiotika

Bifidobakterie jsou běžně užívány jako probiotika pro lidskou výživu v produktech, jako jsou jogurty, sýry a jiné mléčné výrobky, kojenecká výživa a potravinové doplňky, tyto produkty mají dlouhou historii používání a jsou považovány za obecně bezpečné (GRAS – Generally recognized as safe). Zájem o využití bifidobakterií ve výživě hospodářských zvířat je zatím spíše okrajový, i když jsou bifidobakterie běžnou součástí zdravé střevní mikrobioty mláďat přežvýkavců a lze u nich očekávat stejný pozitivní efekt na zdravotní stav hostitele, jako je tomu u lidí.^{3,4} Pokud jsou podávána probiotika mláďatům přežvýkavců, pak je důležitý výběr probiotik s cílovým účinkem na tlusté střevo a ne na podporu mikrobiální skladby bachoru, ten totiž ještě není u mláďat vyvinut.²⁷ Doposud bylo izolováno a identifikováno okolo padesáti druhů bifidobakterií, z čehož převážná část je z zvířecího původu. Druhově složení bifidobakterií je u telat a dospělých přežvýkavců rozdílné, což je důležité zohlednit při výběru probiotického kmene.²⁴

Přítomnost bifidobakterií ve střevním mikrobiomu ve vysokých počtech je spojována s dobrým zdravotním stavem hostitele. Bifidobakterie pomáhají udržovat rovnováhu gastrointestinálního traktu tím, že snižují možnost bakteriální infekce. Inhibiči různých druhů patogenů bifidobakteriemi dokazují mnohé studie.^{23,28,29} Bifidobakterie mohou produkovat různé antimikrobiální látky, jako jsou organické kyseliny nebo bakteriociny, dále mají schopnost posilovat slizniční imunitu, čímž přispívají k celkovému zlepšení zdravotního stavu hostitele.

Antimikrobiální potenciál bifidobakterií

Mezi nejvýznamnější výhody bifidobakterií patří modulace obranné odpovědi hostitele a ochrana proti infekčním chorobám. Mechanismy, kterými střevní bakterie ovlivňují zdraví hostitele, jsou často složité a mnohostranné. Bakteriociny a mastné kyseliny jsou jen dva příklady látek, které mohou přispět k funkčnosti probiotika v gastrointestinálním traktu savců.³⁰ Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou hlavním konečným produktem metabolismu sacharidů u bifidobakterií.³¹ Podle Dicks a Botes bifidobakterie produkují kyselinu octovou a mléčnou v poměru 3 : 2, tyto kyseliny mají lepší účinek proti gramnegativním patogenům a kvasinkám v gastrointestinálním traktu než kyseliny produkované *Lactobacillus* sp.,²³ také podle Gilliland je acetat účinný proti gramnegativním bakteriím, plísním a kvasinkám.³² Nocek a Kautz uvádějí, že probiotické bakterie udržují stálou hladinu kyseliny mléčné a podporují rozvoj bakterií užitkových laktát v trávicím traktu, což vede k omezení vzniku acidózy.³³ Podle Fukuda et al. acetat produkovaný bifidobakteriemi zlepšuje střevní obranu zprostředkovanou buňkami epitelu, a tím chrání hostitele před smrtícími infekcemi.³¹ Studie provedená na myším modelu ukázala, že pokud byly myši před inokulací *Escherichia coli* O157 kolonizovány kmenem *B. longum* ssp. *longum* JCM 1217T, bylo tak zabráněno jejich smrti, která

nastala u skupiny bezmikrobiálních myši bez bifidobakterií. Nicméně, tento pozitivní efekt bifidobakterií byl sledován jako kmenově specifický, jelikož například kmen *B. adolescentis* JCM1275T nedokázal zabránit smrti vyvolané *E. coli* O157. Také koncentrace acetátu byla významně vyšší v myším trusu u skupiny myši kolonizovaných kmenem *B. longum* ssp. *longum* JCM 1217T.

Bakteriociny jsou antibakteriální peptidy, které jsou produkovány širokým spektrem různých bakterií, včetně bakterií rodu *Bifidobacterium*. První záznam o bifidobakteriálních bakteriocinech pochází z roku 1980.³⁴ Bakteriociny produkované bifidobakteriemi vykazují antimikrobiální aktivitu proti patogenním mikroorganismům, jako jsou bakterie *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a některým kvasinkám.^{34,35} Produkce bakteriocinů nemusí sloužit jen k ochraně proti potenciálním patogenním bakteriím vyskytujícím se v trávicím traktu a ke kontrole šíření škodlivých a patogenních bakterií v tlustém střevě, ale také by mohla být využita ke zvýšení konkurenceschopnosti bifidobakterií v různých ekosystémech a jejich roli při konzervaci potravin.³⁶ Bakteriocin produkující kmeny bifidobakterií jsou například *B. bifidum* NCFB 1454 produkující bifidocin B;³⁷ *B. longum*-DJO10A produkující bisin;³⁸ *B. thermophilum* RBL67 produkující thermophilicin B67.³⁹ Produkce bakteriocinů byla detekována u některých kmenů bifidobakterií jak lidského původu, tak zvířecího původu. Navíc přítomnost této vlastnosti je žádoucí při selekci probiotických bakterií pro živočišnou produkci.

Závěr

Ačkoli znalosti a zkušenosti o účinku bifidobakterií stále přibývá, informace týkající se jejich působení na hostitele nejsou úplné a do budoucna je třeba více pochopit mechanismus jejich účinku. Nicméně je zde velký potenciál pro jejich využití jako probiotik ve výživě telat a dalších hospodářských či domácích zvířat.

Práce na této problematice je podporována grantem GP14-31984P.

Literatura:

- MURPHY, W. J., LARKIN, D. M., EVERTS-VAN DER WIND, A., BOURQUE, G., TESLER, G., AUWIL, L. Evolution: Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. *Science* 2005;309:613-617.
- SOTO, L. P., FRIZZO, L. S., AVATANE, E., ZBRUN, M. V., BERTOZZI, E., SEQUEIRA, G. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Animal Feed Science and Technology* 2011;165:176-183.
- ABE, F., ISHIBASHI, N., SHIMAMURA, S. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci* 1995;78:2838-2846.
- VLKOVA, E., TROJANOVA, I., RADA, V. Distribution of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiologica* 2006;51:325-328.
- LEY, R. E., HAMADY, M., LOZUPONE, C., TURNBAUGH, P. J., RAMEY, R. R., BIRCHER, J. S., SCHLEGEL, M. L., TUCKER, T. A., SCHRENZEL, M. D., KNIGHT, R., GORDON, J. I. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008;320:1647-1651.
- LEY, R. E., LOZUPONE, C. A., HAMADY, M., KNIGHT, R., GORDON, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Computer* 2009;6:776-788.

7. MACKIE, R. I., AMINOV, R. I., WHITE, B. A., MCSWEENEY, C. S. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. In: CRONJE, P. B. (Ed.), *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. CAB International, London, UK, 2000;61-77.
8. FRIZZO, L. S., ZBRUN, M. V., SOTO, L. P., SIGNORINI, M. L. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Animal Feed Sci Technol* 2011;169:147-156.
9. GAREAU, M. G., WINE, E., SHERMAN, P. M. Early life stress induces both acute and chronic colonic barrier dysfunction. *NeoReviews* 2009;10:e191-e197.
10. SIGNORINI, M. L., SOTO, L. P., ZBRUN, M. V., SEQUEIRA, G. J., ROSMINI, M., FRIZZO, L. S. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res Vet Sci* 2012;93:250-258.
11. ANADÓN, A., ROSA MARTÍNEZ-LARRANAGA, M., ARANZAZU MARTÍNEZ, M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006;45:91-95.
12. BUNESOVA, V., VLKOVA, E., RADA, V., KILLER, J., MUSILOVA, S. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: Differences and similarities. *Beneficial Microbes* 2014;5:377-388.
13. CHAUCHEYRAS-DURAND, F., DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* 2010;1:3-9.
14. CHEIKHYOUSSEF, A., CHEIKHYOUSSEF, N., CHEN, H. Q., ZHAO, J. X., TANG, J., ZHANG, H., CHEN, W., BIFIDIN I. A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCR. 14602: Purification and partial amino acid sequence. *Food Control* 2010;21:746-753.
15. DIBNER, J. J., RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Sci* 2005;84:634-643.
16. DICKS, L. M. T., BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes* 2010;1:11-29.
17. ELLIS-IVERSEN, J., PRITCHARD, G. C., WOOLDRIDGE, M., NIELEN, M. Risk factors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in young cattle on English and Welsh farms. *Preventive Vet Med* 2009;88:42-48.
18. FEY, P. D., SAFRANEK, T. J., RUPP, M. E., DUNNE, E. F., RIBOT, E., IVERN, P. C., BRADFORD, P. A., ANGULO, F. J., HINRICH, S. H. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *New Eng J Med* 2000;342:1242-1249.
19. FUKUDA, S., TOH, H., HASE, K., OSHIMA, K., NAKANISHI, Y., YOSHIMURA, K., TOBE, T., CLARKE, J. M., TOPPING, D. L., SUZUKI, T., TAYLOR, T. D., ITOH, K., KIKUCHI, J., MORITA, H., HATTORI, M., OHNO, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469:543-547.
20. GAGGIA, F., MATTARELLI, P., BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 2010;141:515-528.
21. GILLILAND, S. E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *J Dairy Sci* 1989;72:2483-2494.
22. 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. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastro Hepat* 2014;11:506-514.
23. LEE, J. H., LI, X. L., O'SULLIVAN, D. J. Transcription Analysis of a Lantibiotic Gene Cluster from *Bifidobacterium longum* DJO10A. *Applied Environment Microbiol* 2011;77:5879-5887.
24. LEWENSTEIN, A., FRIGERIO, G., MORONI, M. Biological properties of SF-68, A new approach for the treatment of diarrheal diseases. *Current Therap Res - Clin Experiment* 1979;26:967-981.
25. LIU, G. R., REN, L., SONG, Z. Q., WANG, C. T., SUN, B. G., Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04 from centenarians' intestine. *Food Control* 2015;50:889-895.
26. MAKRAS, L., DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J* 2006;16:1049-1057.
27. MARTÍNEZ, F. A. C., BALCIUNAS, E. M., CONVERTI, A., COTTER, P. D., OLIVEIRA, R. P. D. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol Adv* 2013;31:482-488.
28. MELLADO, M., LOPEZ, E., VELIZ, F. G., DE SANTIAGO, M. A., MACIAS-CRUZ, U., AVENDANO-REYES, L., GARCIA, J. E. Factors associated with neonatal dairy calf mortality in a hot-arid environment. *Livestock Science* 2014;159:149-155.
29. MELLADO, M., LOPEZ, E., VELIZ, F. G., DE SANTIAGO, M. A., MACIAS-CRUZ, U., AVENDANO-REYES, L., GARCIA, J. E., Factors associated with neonatal dairy calf mortality in a hot-arid environment. *Livestock Sci* 2014;1(159):149-155.
30. MOORE, J., 2004. The use of probiotics in the calf: An overview. *Cattle Practice* 12, 125-128.
31. NOCEK, J. E., KAUTZ, W. P., 2006. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89, 260-266.
32. SEKIROV, I., RUSSELL, S. L., ANTUNES, L. C. M., FINLAY, B. B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 90, 859-904.
33. SERVIN, A. L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *Fems Microbiology Reviews* 28, 405-440.
34. SIGGERS, R. H., THYMANN, T., SIGGERS, J. L., SCHMIDT, M., HANSEN, A. K., SANGILD, P. T. Bacterial colonization affects early organ and gastrointestinal growth in the neonate. *Livestock Sci* 2007;109:14-18.
35. TIMMERMAN, H. M., KONING, C. J. M., MULDER, L., ROMBOUTS, F. M., BEYENEN, A. C., 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 219-233.
36. VLKOVA, E., RADA, V., SMEHILOVA, M., KILLER, J., 2008. Auto-aggregation and Co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica* 53, 263-269.
37. WALLACE, R. J., NEWBOLD, C. J. Probiotics for ruminants. In: FULLER, R. (Ed): *Probiotics – the scientific basis*. Chapman & Hall, London 1992:317-353.
38. WALLE, K. V., VANROMPAY, D., COX, E. Bovine innate and adaptive immune responses against *Escherichia coli* O157:H7 and vaccination strategies to reduce faecal shedding in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;152:109-120.
39. YLDIRIM, Z., JOHNSON, M. G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Food Protection* 1998;61:47-51.

Adresa autorky:**Ing. Věra Bunešová, Ph.D.****Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky****Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů****Česká zemědělská univerzita v Praze****Kamýcká 129****165 21 Praha 6**

9.6 Příloha č. 6:

Malá zvířata

Odlišnosti v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců a mož-

M. GEIGEROVÁ, E. VLKOVÁ, E. SKŘIVANOVÁ, V. BUNEŠOVÁ

Česká zemědělská univerzita v Praze

XXXXXX

SOUHRN

Geigerová M., Vlková E., Skřivanová E., Bunešová V. Odlišnosti v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců a možnosti jejího ovlivnění. Veterinářství 2014;64:

Trávicí trakt savců je osídlen mikrobiotou, která má zásadní vliv na zdraví jedince. Hostitel poskytuje přítomným bakteriím živiny a stabilní prostředí, střevní bakterie pomáhají utvářet střevní sliznici, stimulují imunitní systém hostitele a poskytují nutričně významné látky. Fyziologické podmínky gastrointestinálního traktu určují množství a druhové zastoupení mikroorganismů. Trávicímu traktu savců dominují bakterie kmenů Firmicutes a Bacteroidetes, přesto je mezi přítomnými rody a druhy bakterií velká diverzita, která je závislá především na fylogenezi savců. Střevní mikrobiota je stabilní systém, který je poměrně obtížně ovlivnitelný. Jedním ze způsobů jeho pozitivního ovlivnění je podávání probiotik a prebiotik.

SUMMARY

Geigerová M., Vlková E., Skřivanová E., Bunešová V. The differences in microbiota of the gastrointestinal tract of various mammalian species and its possible influence. Veterinářství 2014;64:

Digestive system of mammals is inhabited by many microorganisms. The intestinal microbiota significantly affects animal health. The mammalian host provides nutrients and stable environment for bacteria, whereas the microbiota helps shaping the host's gut mucosa and provides nutritional contributions. Bacterial density and diversity in gastrointestinal tract is determined by its physiological conditions. Firmicutes and Bacteroidetes usually dominate in intestine of mammals, but the bacterial diversity is huge and reflects mainly mammalian phylogeny. Intestinal microbiota is stable system that is very difficult to affect. One way to improve microbial composition in the gut of animal is diets supplementation with probiotics and prebiotics.

Vývoj a složení střevní mikrobioty savců

Mikrobiální osídlení určitého prostředí, dříve označované jako mikroflóra, je v současné době označováno pojmem mikrobiota. Všechna zvířata jsou hostiteli celé řady rozličných prokaryotických i eukaryotických symbiontů, což přináší určité fyziologické výhody. Interakce mezi mikro- a makroorganismem je důležitá zejména v gastrointestinálním traktu (GIT). Vývoj mikrobioty trávicího traktu začíná okamžikem porodu, kdy je sterilní trávicí trakt mláďate osídlován přirozenou mikrobiotou matky a mikroorganismy prostředí.¹ Struktura fyziologické mikrobioty se v průběhu života mění. Zpočátku je silně ovlivněna způsobem porodu a prostředím, kde porod probíhá, poté je formována nejbližším okolím. Mláďata savců přicházejí do styku s matčiny výkaly a kůží

a intestinální bakterie přijímají mláďata i během sání mléka. Jelikož trávicí trakt těsně po porodu obsahuje kyslík, první mikroorganismy, které kolonizují trávicí trakt savců, jsou fakultativně anaerobní bakterie. Například u přežvýkavců osm hodin po porodu dominují bakterie *E. coli*, které jsou při běžném průběhu vývoje mikrobioty nahrazeny do jednoho dne bakteriemi mléčného kvašení a bifidobakteriemi.² Bifidobakterie jsou nejpočetnější bakteriální skupinou u většiny mláďat savců v období mléčné výživy.³ U některých mláďat savců mohou převažovat laktobacily, tak je tomu například u selat.⁴ Přirozená kolonizace pozitivně působícími bakteriemi je omezena, pokud jsou mláďata hospodářských zvířat v brzké době odebrána od svých matek a jsou ustájena v individuál-

	Byložravci		Všežravci	Masožravci	Typ střevní mikrobioty
	přednítrávení	zadní trávení			
ovce a kráva žirafa kůň nosorožec polární medvěd medvěd hnědý panda obří panda červená	ovce, kráva, žirafa				Typ 1 přední trávení
pes hyena lev		nosorožec, kůň			Typ 2 zadní trávení
šimpanz člověk gorila orangutan opice podčeledi Colobinae	opice podčeledi Colobinae	gorila, orangutan			Typ 3 folivor nebo všežravec
pavián čhápán lemur			šimpanz, člověk, pavián, čhápán, lemur		Typ 4 všežravec nebo frugivor
		panda obří, panda červená	medvěd hnědý	polární medvěd, pes, hyena, lev	Typ 5 masožravec

Obr. 1 – Schématické znázornění vlivu hostitelské fylogeneze a složení stravy na střevní mikrobiotu savců¹⁶

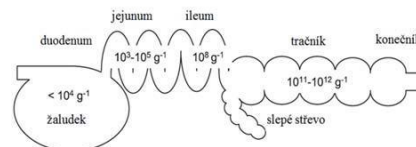
a – fylogenetická příbuznost vybraných savců; b – rozdělení zástupců savců dle typu přijímané potravy a jejich typu střevní mikrobioty. Příbuzná zvířata mají obvykle podobné složení potravy, podobnou morfologii střev a typ střevní mikrobioty

ných boxech.⁵ Díky tomu může vzniknout nerovnováha ve složení gastrointestinální mikrobioty mláďete a zvyšuje se riziko průjemových onemocnění.

Po ukončení mléčné výživy se formuje mikrobiota dospělého jedince a vyvíjí se v závislosti na různorodé expozici okolního prostředí. Odhaduje se, že savcí mikrobiota trávicího traktu je složena z 500 až 1000 bakteriálních druhů.⁶ Většina aktuálních informací o složení a činnosti gastrointestinální mikrobioty souvisí se studii týkající se lidské populace. Avšak počet studií zabývajících se mikroorganismy trávicího traktu zvířat se zvyšuje, zejména se jedná o studie zaměřené na mikrobiotu psů a koček.⁷ Pomocí molekulárně-genetických metod bylo prokázáno, že savcí GIT obsahuje bakterie, archea, plísňe, prvky a viry.⁸ Bakterie jsou nejpočetnější a nejvíce metabolicky aktivní skupinou. Například nedávné studie ukazují, že bakteriální skupina může tvořit až 98 % celkové střevní mikrobioty u psů, archea a eukaryota jsou zastoupeny ve 2 %.⁹ Podobné rozdělení střevní mikrobioty je i u koček. Bakterie tvoří majoritní skupinu (97,8 %) a ostatní mikroorganismy jsou v množství menším než 3 %.¹⁰ V lidské střevní mikrobiotě převládají po šesti měsících věku bakterie kmenů *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, poměrně běžné jsou i bakterie kmene *Verucomicrobia*. Nízké počty jsou pak nalézány u kmene *Proteobacteria*.¹¹ V několika rozsáhlých studiích, založených na sekvenování 16S rRNA, bylo zjištěno, že u savců převažují bakterie kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Více než 80 % sekvenovaných bakterií patří do těchto dvou skupin.¹² I když je savcí GIT osídlen bakteriemi patřícími pouze do několika kmenů, rodová a druhová diverzita bakterií je obrovská. Celá řada bakteriálních druhů byla nalezena jak v trávicím traktu lidí, tak různých dalších savců, ale některé bakterie jsou hostitelsky specifické a byly nalezeny u konkrétních druhů zvířat. Jako příklad můžeme uvést bakterie druhu *Bifidobacterium magnum*, *B. cuniculi* a *B. saeculare*, které byly nalezeny pouze v trávicím traktu králíků.¹³

Fylogeneze mikrobioty trávicího traktu savců

Společné soužití mikro a makroorganismů se vyvíjí více než miliardu let.¹⁴ Jedná se o jeden z nejosložitějších mikrobiálních ekosystémů, který je průběžně ovlivňován faktory, které souvisejí s hostitelem nebo s vnějším prostředím.⁷ Nejen fylogeneze, ale i strava hostitele ovlivňuje bakteriální diverzitu. Nicméně, obrázek 1 jasně ukazuje, že typ mikrobioty je závislý více na fylogenetické příbuznosti zvířat než na složení potravy. Bakteriální diverzita trávicího traktu se zvyšuje od masožravců přes všežravce až po býložravce, u kterých je střevní mikrobiota nejrozmanitější.¹⁵ Předkové savců měli zuby, které byly uzpůsobené pro příjem hmyzu, masa nebo ovoce. Začlenění rostlinné stravy přišlo evolučně později. Různé živočišné linie býložravců se vyvinuly nezávisle na sobě a nyní se odhaduje, že 80 % savců jsou býložravci.¹⁶ Mikroorganismy byly nezbytně nutné pro vývoj býložravců. Savcí enzymy neumožňují trávení celulózy a dalších komplexních sacharidů, které jsou základním stavebním kamenem rostlinné stravy, tuto funkci zastupují bakteriální enzymy.¹⁷ Doba trávení musela být prodloužena, aby byl poskytnut dostatečný čas pro činnost mikrobiálních enzymů. Toho bylo docíleno prodloužením části GIT nebo kaprofágií. Klasickým příkladem konvergentní evoluce je prodloužení trávicího traktu dvěma způsoby. Prvním způsobem bylo prodloužení části GIT před žaludkem (přední trávení). Druhou možností bylo prodloužení GIT za žaludkem (zadní trávení).¹⁶ Zvláštním fylogenetickým vývojem prošly mořští savci. Ti mají obecně bohatší střevní mikrobiotu než savci žijící na zemi. Jejich poměrně nedávný vývoj a odlišná historie ve srovnání se suchozemskými savci se odráží i v rozdílné mikrobiotě. Mořští masožravci mají oproti suchozemským savcům snížený počet bakterií kmene *Firmicutes* a zvýšený počet bakterií kmene *Fusobacteria*. Jak už bylo výše zmíněno, suchozemští býložravci mají rozmanitější gastrointestinální mikrobiotu víc než všežravci nebo masožravci. Stejná posloupnost platí i u mořských savců. Mořští býložravci mají tedy obecně nejbohatší střevní mikrobiotu ze všech savců.¹⁸



Obr. 2 – Znázornění počtu bakterií v jednotlivých částech trávicího traktu monogastrických savců.

Mikrobiota jednotlivých částí GIT savců

Mikrobiální složení trávicího traktu je v jeho jednotlivých částech rozdílné (obr. 2). Mechanické a enzymatické trávení potravy začíná v ústech, kde jsou přítomné různé druhy bakterií, virů a plísňů. Bakterie jsou přítomné v množství 10^7 KTJ/g. Mezi typické zástupce ústní mikrobioty patří rody *Streptococcus* sp., *Neisseria* sp., *Lactobacillus* sp. a *Micrococcus* sp. Většina bakteriálních druhů je považována za komenzály ústní dutiny, přesto některé z nich lze spojit se vznikem biofilmu, který je odolný proti mechanickému namáhání a antibiotické léčbě. Některé bakterie produkují organické kyseliny, které mohou narušit zubní sklovinu a významně tak přispívají ke vzniku zubního kazu.¹⁹

Trávicí trakt savců pokračuje přes hltan a jícen do žaludku. Nízké pH v žaludku má baktericidní účinek a je jedním z neúčinnějších obran těla proti patogenům. Přesto některé bakteriální druhy osidlují nepříznivé prostředí žaludku v množství 10^2 - 10^4 KTJ/g nebo ml. Lze použít obě jednotky, protože bakterie jsou přítomné jak v žaludeční šťávě, tak i v žaludeční stěně. Některá monogastriční zvířata, příkladem jsou koně a prasata, mají ve skvamózní části žaludku poměrně vysoký počet laktobacilů.^{20,21} Tato oblast se vyznačuje přímou adhezí bakterií na epitelální buňky. Hlodavci mají méně kyselé žaludeční prostředí (pH 3-5), což je způsobeno trvalou přítomností potravy a díky tomu mají i početnější mikrobiotu, která je složena z acidotolerantních druhů laktobacilů.¹² Nejznámější bakterií obývajících žaludeční prostředí je podmíněný patogen *Helicobacter pylori*. Odhaduje se, že polovina lidské populace má *H. pylori* v žaludku, ale nevykazuje žádné známky nemoci. *H. pylori* i další druhy mohou způsobovat gastritidy nejen u lidí, ale i zvířat, jako jsou psi, prasata, ovce a skot.^{12,22} Podle jedné zahraniční studie je žaludek zdravých psů osídlen bakteriemi nejméně ze 4 kmenů, ovšem i navzdory této rozmanitosti převládá v žaludeční mikrobiotě již zmíněný *H. pylori*.⁷

Největší rozdíl v trávení je mezi monogastriky a přežvýkavci. U přežvýkavců je nejdříve potrava fermentována mikroorganismy v bacheru a až poté je trávena v tenkém a tlustém střevě. Enzymatické trávení zvířete nastupuje až po fermentaci a jsou jim stráveni i prvoci a bakterie. Zatímco u monogastrů probíhá hlavní fermentace až v tlustém střevě. K trávení mikroorganismů nedochází, protože mikrobiální fermentaci potravy předchází její trávení enzymy hostitele. Bacher přežvýkavců obsahuje až 10^{11} KTJ/g živých prokaryotických a eukaryotických organismů. Hlavní skupinou jsou bakterie, které jsou přítomné v počtech 10^{10} – 10^{11} KTJ/g, dále prvoci 10^5 – 10^6 KTJ/g a přítomné jsou i kvasinky, fágy a anaerobní houby.²³ V bacheru jsou nejvíce zastoupeny bakterie kmenů *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, v minoritním množství jsou bakterie kmenů *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Tenericutes*. Zastoupení bakterií v bacheru se značně liší mezi jednotlivými jedinci přežvýkavců. Například bakterie kmene *Bacteroidetes* jsou v počtech velmi variabilní, jejich zastoupení se pohybuje v rozmezí od 26 % do 70 %.²⁴ Zásadní je přítomnost bakterií, které se podílí

na štěpení celulózy, mezi nevyznamenější celulólytické bakterie přítomné v bacheru patří *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*.²⁵ Přítom u některých jedinců skotu nemusí být *F. succinogenes* přítomna vůbec.²⁴

Kaudálním směrem se množství bakterií zvyšuje, v tenkém střevě jsou bakterie přítomné v počtu okolo 10^8 KTJ/g, v kolonu v počtu až 10^{12} KTJ/g.¹² V tlustém střevě u monogastričních zvířat převažují bakterie kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Ostatní kmeny jako *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* a *Tenericutes* jsou v intestinálním traktu také přítomny, ale jejich počty jsou většinou malé.⁷ Nicméně údaje o počtech bakteriálních skupin se ve vědeckých studiích liší. Například v jedné zahraniční studii autor uvádí, že u zdravých psů a koček je v GIT víc než 90 % bakterií kmene *Firmicutes*.²⁶ Zatímco jiní autoři zjistili, že v trávicím traktu psů je bakterií kmene *Firmicutes* okolo 35 % a u koček je to pouhých 13 %.^{9,10} Důvody těchto rozdílných výsledků mohou samozřejmě být způsobeny variabilitou střevních mikroorganismů, rozdílnými způsoby extrakce DNA nebo rozdíly mezi používanými technikami v charakterizaci mikroorganismů.^{27,28,29} Tlusté střevo se skládá ze slepého střeva, tračnicku a konečnicku a jeho morfologie se liší u různých druhů zvířat v závislosti na typu přijímané potravy. U všech savců je obsah tlustého střeva fermentován přítomnými bakteriemi, tento proces je nejjintenzivnější u býložravců, kteří nepřežvokují. K procesu fermentace dochází v tračnicku a slepém střevě. Potrava, která vyžaduje delší fermentační proces, obvykle vstupuje do slepého střeva, i když je slepé střevo slabě vyvinuté, jako je tomu například u psů. Uspořádání a vyvinutí slepého střeva se druhově liší. Významně mají vyvinuté slepé střevo například koně, prasata a hlodavci. V intestinálním traktu savců se kaudálním směrem snižuje pH. Pokles pH v tračnicku a slepém střevě lze připsat k rozsáhlé bakteriální fermentaci a vzniku těkavých mastných kyselin v této oblasti trávicího traktu.³⁰

Funkce střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota je už dlouho předmětem zájmu vědeckých studií, protože se zapojuje do různých fyziologických procesů v těle hostitele. Příkladem je zpětné vstřebávání elektrolytů, vody a produkce vitamínu B a K.^{31,32} Mikroorganismy přítomné v tlustém střevě získávají energii ze sacharidů, které nejsou stráveny v tenkém střevě. Toho je dosaženo pomocí fermentace za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a jiných produktů. Nejvýznamnějšími SCFA jsou kyselina octová, propionová a máselná. Produkce SCFA příznivě ovlivňuje metabolismus glukózy a lipidů v játrech. Jejich přítomnost snižuje pH v tlustém střevě a tak vzniká nevhodné prostředí pro patogenní bakterie.³² Kyselina máselná je navíc využívána jako zdroj energie pro enterocyty.³³ Fermentace nestrávených sacharidů bakteriemi zlepšuje

absorpci vápníku, hořčíku, zinku a železa v tlustém střevě.³⁴ Mezi další funkce mikrobioty GIT patří i stimulace produkce střevního hlenu, udržení střevní integrity a stimulace střevní angiogeneze.⁷ Střevní mikrobiota se do značné míry podílí na vývoji a průběžné stimulaci imunity. Nejcitlivějším obdobím pro ovlivnění mikrobioty jedince je období po narození. Povrch sliznic je postupně kolonizován a dochází k vyzrávání složek imunitního systému. Zdravá střevní mikrobiota osidluje povrchy sliznic a tak brání uchycení a pomnožení patogenních mikroorganismů.³⁵

Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty savců

Přesto, že střevní mikrobiota je velmi stabilní systém, který je obtížně ovlivnitelný, existují faktory, které složení mikrobioty částečně ovlivňují. Mezi tyto faktory patří změna diety, příjem specifických dietních složek ve formě různých krmných aditiv, popřípadě antibiotik a rozdílné prostředí. Bylo prokázáno, že složení střevní mikrobioty se liší, pokud zvíře žije v zajetí ve srovnání se zvířetem stejného druhu, které žije ve volné přírodě. Jedná se o důsledek výše zmíněných faktorů.³⁶ Poměrně významný faktor ovlivňující střevní mikrobiotu je používání různých terapeutických látek včetně antibiotik. Tyto látky mohou vést k nežádoucím změnám gastrointestinální mikrobioty. Antibiotika jsou běžně používána ve veterinární medicíně. Zatímco účinek antibiotik na lidskou střevní mikrobiotu je poměrně dobře prozkoumán, u zvířecí populace existuje málo studií. V jedné studii byly pozorovány změny v mikrobiotě u psů v tenkém střevě po podání antibiotika tylosinu. Výsledkem byla obměna množství různých bakteriálních skupin, která nebyla doprovázena žádným zjevným klinickým účinkem.³⁷ Poznamenejme, že střevní mikrobiota se úzce podílí na zdraví hostitele, vedlo k myšlence, že by bylo možné manipulovat s mikrobiotou ku prospěchu hostitele. K dosažení tohoto cíle jsou používány různé přístupy. Jednou z možností je podávání probiotik. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos.³⁸ U hospodářských zvířat bylo mnohokrát dokumentováno snížení výskytu průjmových onemocnění, ale i omezení infekcí dýchacího systému při aplikaci probiotik. K dalším pozitivním vlivům patří zlepšení konverze živin a tím zvýšení přírůstků, ale i zvýšení produkce a zlepšení kvality mléka. Vzhledem k tomu, že probiotika omezují výskyt patogenů v trávicím traktu, dochází ke snížení kontaminace jatečně opracovaného těla při porážce.^{39,40}

K faktorům, jako jsou věk, druh zvířete, způsob krmení a ustájení, by se mělo přihlížet při volbě způsobu aplikace probiotik. Probiotika mohou být aplikována samostatně nebo společně s krmivem či vodou. Společné podávání krmiva s probiotikem ale nese určité riziko možné interakce probiotických bakterií s komponenty krmiva. Vlastní způsob aplikace probiotika

může být ve formě pasty, lyofilizovaného prášku nebo aerosolu. Nejčastější formou jsou lyofilizované prášky. Poměrně zásadní otázkou je výše účinné dávky. Důležitý je obsah živých buněk, kterých by mělo být aspoň 10⁹/g krmné směsi. Možné je také volit mezi jednodukovými a víceukovými preparáty. Jako efektivnější se ukázalo být podávání víceukových probiotik.³⁹ Výhodou víceukových probiotik je vyšší efektivita díky synergickému účinku jednotlivých kmenů. Co se týče věku a aplikace probiotik, výraznější účinek je u mladých zvířat. Novorozená mláďata mají prakticky sterilní trávicí trakt, a proto je u nich vyšší pravděpodobnost kolonizace probiotickými bakteriemi. Pokud jsou podávána probiotika mláďatům přežvýkavců, pak je důležitý výběr probiotik s cílovým účinkem na tlusté střevo a ne na podporu mikrobiální skladby bacheloru, ten totiž ještě není vyvinut. Vhodné je podávat probiotika ve stresujících obdobích. U hospodářských zvířat se jedná o dobu odstavu, začátek laktace nebo změnu krmné dávky.

Co se týká výběru vhodného kmene, obecně se uvádí, že aktivita probiotických bakterií je často druhově specifická a může se lišit také v rámci jednoho druhu.⁴¹ Pro zvýšení pravděpodobnosti kolonizace je doporučeno použít kmen původně izolovaný z trávicího traktu druhu zvířete, pro který jsou daná probiotika určena. Mezi bakterie, které se běžně používají v Evropské unii jako krmná aditiva pro hospodářská zvířata, patří především gram-pozitivní bakterie rodu *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp. a některé kvasinky rodu *Saccharomyces* sp. a *Kluyveromyces* sp.⁴² Pro prasata se jako probiotika používají různé bakterie, především by měly být vybírány laktobacily a jiné bakterie mléčného kvašení, které jsou přirozeně přítomné v trávicím traktu. Příkladem jsou bakterie druhu *Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii* a *Enterococcus faecium*.⁴³ Použití a efektivita bifidobakterií jako probiotikum u prasat je diskutabilní, protože tento rod bakterií je v trávicím traktu přítomen minoritně. Naopak u telat, která jsou na mléčné výživě a nemají vyvinutý bachor, jsou bifidobakterie vhodným probiotikem. Tyto bakterie jsou přirozenou součástí mikrobioty jejich trávicího traktu.⁴⁴ U dospělých přežvýkavců je cíleným orgánem při podávání probiotik bachor. Mikrobiota bacheloru je podstatně hůře ovlivnitelná, protože většina typických bachelorových mikroorganismů je kultivačně náročná. Jako probiotikum pro dospělé přežvýkavce jsou například využívány kvasinky rodu *Saccharomyces*, které podporují aktivitu celulólytických bakterií.

Pro podpoření probiotik nebo prospěšných bakterií přítomných v trávicím traktu zvířat mohou být podávána prebiotika. Prebiotika jsou nestravitelné látky, které jsou selektivně metabolizovány střevními bakteriemi a tím prospívají zdraví hostitele.⁴⁵ Pokusů s prebiotiky na hospodářských zvířatech je poměrně málo. V jedné zahraniční studii byl sledován efekt galaktooligosacharidů v *in vitro* podmínkách na růst laktobacilů a bifidobakterií izolovaných z výkalů prasat a ze stolice člověka. Autoři

uvádějí, že růst jak lidských, tak prasečích bakteriálních izolátů byl podpořen prebiotiky, ale mezi jednotlivými izoláty byl statisticky významný rozdíl.⁴⁶ Toto zjištění podporuje názor, že výsledky z různých studií zaměřených na podávání prebiotik lidské populaci nemůžou být převedeny na zvířata, aniž by byl proveden výzkum na konkrétním druhu zvířete.

Poděkování: Práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (GAČR GP14-31984P).

Literatura:

- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. Getting better with bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 2005;98:1303-1315.
- Moore, J. The use of probiotics in the calf: An overview. *Cattle Pract* 2004;12:125-128.
- Hopkins, M. J., Sharp, R., Macfarlane, G. T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001;48:198-205.
- Konstantinov, S. R., Awati, A. A., Williams, B. A., et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ Microbiol* 2006;8:1191-1199.
- Bunešová, V., Domig, K. J., Killer, J., et al. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* 2011;1016:1-3.
- Kim, H. B., Borewicz, K., White, B. A., et al. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the reces of commercial pigs. *Vet Microbiol* 2011;153:124-133.
- García-Mazcorro, J. F., Minamoto, Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. *Arch Med Vet* 2013;45:111-124.
- Suchodolski, J. S. Intestinal microbiota of Dogs and Cats: a bigger world than we thought. *Vet Clin Small Anim* 2011;41:261-272.
- Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., et al. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J* 2011;5:639-649.
- Tun, H. M., Bar, M. S., Khin, N., et al. Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. *J Microbiol Methods* 2012;88:369-376.
- Palmer, Ch, Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., Brown, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biology* 2007;5:1556-1573.
- Leser, T. D., Molbak, L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ Microbiol* 2009;11:2194-2206.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Killer, J., Musilová, Š. Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Benef Microbes* 2014; in press.
- Neish, A. S. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microb Infect* 2002;4:309-317.
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C. A., et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008;320:1647-1651.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J. I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:776-788.
- Russel, J. B., Rychlik, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 2001;292:1119-1122.
- Nelson, T. M., Rogers, T. L., Brown, M. V. The gut bacterial community of mammals from marine and terrestrial habitats. *PLoS ONE* 2013;8:1-8.
- Avila, M., Ojcius, D. M., Yilmaz, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol* 2009;28:405-411.
- Barrow, P. A., Brooker, B. E., Fuller, R., Newport, J. Attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J Appl Bacteriol* 1980;48:147-154.
- Yuki, N., Shimazaki, T., Kushiro, T., Watanabe, K., Uchida, K., Yuyama, T., Morotomi, M. Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:5030-5034.
- Walker, M. M., Talley, N. J. Review article: bacteria and pathogenesis of disease in the upper gastrointestinal tract – beyond the era of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharm Ther* 2014;4:39:767-779.
- Wallace, R. J., Newbold, C. J. Probiotics for ruminants. In: Fuller, R. Probiotics – The scientific basis. London: Chapman & Hall, 1992:317-353.
- Jami, E., Mizrahi, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota Gross individual animals. *PLoS ONE* 2012;7:e33306.
- Koike, S., Kobayashi, Y. Development and use of competitive PCR assay for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;204:361-366.
- Handl, S., Dowd, S. E., García-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol* 2011;76:301-310.
- García-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. Evaluation of intra-stool variability of three lactic acid bacterial genera in dogs by quantitative real-time PCR. *J Vet Intern Med* 2009;23:756-757.
- Zoetendal, E. G., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D., Abee, T., de Vos, W. M. Dna isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* 2001;24:405-410.
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., Hugenholtz, P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 2010;12:118-123.
- Godoy-Vitorino, F., Goldfarb, K. C., Karaoz, U., et al. Comparative analysis of foregut and hindgut bacterial communities in goats and cows. *ISME J* 2012;6:531-541.
- Conly, J. M., Stein, K. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Progr Food Nutr Sci* 1992;16:307-343.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin Nutr* 1997;16:3-11.
- Louis, P., Flint, H. J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 2009;294:1-8.
- Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., van den Heuvel, E. G. H. M., Schrezenmeier, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001;73:459-464.
- Hooper, L. V., Macpherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010;10:159-169.
- Nelson, T. M., Rogers, T. L., Carlini, A. R., Brown, M. V. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Evol Ecol Res* 2012;15:1132-1145.
- Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Westermarck, E., et al. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol* 2009;9:210.
- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO/WHO, 2002, London, UK.
- Timmerman, H. M., König, C. J. M., Mulde, L., et al. Monostrain, multistain and multispecies probiotics – a comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* 2004;153:88-93.
- Fuller, R. Probiotics 2: Applications and practical aspects. London, Chapman and Hall, 1997:212.
- Gardiner, G. E., Casey, P. G., Casey, G., et al. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1895-1906.
- Anadón, A., Martínez-Larranaga, R. M., Martínez, A. M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul Toxicol Pharm* 2006;45:91-95.
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., Møller, K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:673-690.
- Bunešová, V., Domig, K. J., Killer, J., et al. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* 2012;18:166-168.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004;17:259-275.
- Martínez, R. C. R., Cardarelli, H. R., Borst, W., et al. Effect of galactooligosaccharides and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 on growth of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698, microbial community structure, and metabolite production in an in vitro colonic model set up with human or pig microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;84:110-123.

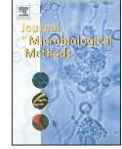
Adresa autorů:

Ing. Martina Geigerová
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129
165 21 Praha 6
e-mail: geigerova@af.czu.cz



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements



Vera Bunesova*, Sarka Musilova, Martina Geigerova, Radko Pechar, Vojtech Rada

Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, Prague 6-Suchbát, 16521, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 October 2014
Received in revised form 7 December 2014
Accepted 23 December 2014
Available online 24 December 2014

Keywords:
Bifidobacteria
Probiotic supplements
Enumeration
Selective media
Mupirocin

ABSTRACT

An international standard already exists for the selective enumeration of bifidobacteria in milk products. This standard uses Transgalactosylated oligosaccharides (TOS) propionate agar supplemented with mupirocin. However, no such standard method has been described for the selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements, where the presence of bifidobacteria is much more variable than in milk products. Therefore, we enumerated bifidobacteria by colony count technique in 13 probiotic supplements using three media supplemented with mupirocin (Mup; 100 mg/l): TOS, Bifidobacteria selective medium (BSM) and modified Wilkins-Chalgren anaerobe agar with soya peptone (WSP). Moreover, the potential growth of bifidobacterial strains often used in probiotic products was performed in these media. All 13 products contained members of the genus *Bifidobacterium*, and tested mupirocin media were found to be fully selective for bifidobacteria. However, the type strain *Bifidobacterium bifidum* DSM20456 and collection strain *B. bifidum* DSM20239 showed statistically significant lower counts on TOS Mup media, compared to BSM Mup and WSP Mup media. Therefore, the TOS Mup medium recommended by the ISO standard cannot be regarded as a fully selective and suitable medium for the genus *Bifidobacterium*. In contrast, the BSM Mup and WSP Mup media supported the growth of all bifidobacterial species.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bifidobacteria are probiotic microorganisms that are widely used in the food industry (Miranda et al., 2011). Probiotic microorganisms are usually available as culture concentrates in dried or deep-freeze form to be added to a food for industrial or home uses (Tripathi and Giri, 2014). In addition to the food probiotics, there are various health products and pharmaceutical preparations containing probiotics on the market (Saad et al., 2013). The most commonly used species of probiotic bacteria in lyophilised form and milk products are *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*. The amount of probiotic bacteria required for therapeutic effect is considered to be in the range of 10^9 cells of live microorganisms per day. To exert a beneficial effect, the bacteria must remain viable in the product until the time of consumption. Commercially available probiotics are usually in the form of freeze-dried, powdered bacteria or in the capsule-packed forms, which can affect their persistence and viability. According to Makinen et al. (2012) there are three major factors governing the stability of probiotics during manufacture and storage; strain robustness, process and storage

conditions. The manufacturer should correctly inform customers about bacteria amounts and species composition in the product. A widely used method for the microbiological control of food quality, including probiotics, is culturing. Different culture media have been proposed for the selective enumeration of bifidobacteria (Ashraf and Shah, 2011; Karimi et al., 2012; Roy, 2001). There also exists an ISO standard for the enumeration of bifidobacteria in food, such as milk products. The ISO standard, denoted by ISO 29981:2010 (IDF 220:2010) use a colony count technique performed at 37 °C under anaerobic conditions on Transgalactosylated oligosaccharides propionate agar (TOS, Yakult Pharmaceutical Industry, Co., Ltd., Tokyo, Japan) supplemented with mupirocin. This method is applicable for milk products such as fermented and non-fermented milk, milk powders, infant formulas and starter cultures. The TOS-mupirocin agar is selective even when bifidobacteria are present in combination with lactic acid bacteria. The basal medium (TOS) has for many years been commercially produced and marketed exclusively by Yakult-Japan. However, both the TOS and mupirocin are now licenced, produced and marketed by VWR in Europe and around the world (Raesi et al., 2013). The use of mupirocin as a selective factor for the isolation and quantification of bifidobacteria in fermented dairy products was first described by Rada and Koc (2000). The authors of this study recommended the use of Wilkins-Chalgren agar (Oxoid, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) supplemented with mupirocin (100 mg/l). This agar was modified with the addition of

* Corresponding author at: Kamycka 129, Prague, Czech Republic.
E-mail address: bunesova@af.czu.cz (V. Bunesova).

soya peptone (5 g/l), L-cysteine (0.5 g/l), and Tween 80 (1 ml/l; Bunešová et al., 2012). Soya peptone contains galactooligosaccharides, which promote the growth of bifidobacteria. Another commercial agar for the enumeration of bifidobacteria is available from Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

However, no standard method has been described for the selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. The use of bifidobacteria in pharmaceutical supplements is becoming increasingly popular, resulting in a wide variety of products being marketed with specific or generic claims of health benefits. These products often contain multispecies probiotic microorganisms indicating the presence of species other than bifidobacteria. The aim of this study was to evaluate different mupirocin selective media for the enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements.

2. Material and methods

2.1. Culture media

Three agars (Table 1) supplemented with mupirocin lithium salt at a concentration of 100 mg/l (Mup; Oxoid, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) were used in this study for the quantification of the most commonly used bifidobacterial species and bifidobacteria in different probiotic supplements.

2.2. Testing of pure bifidobacterial strains

The growth characteristics of *Bifidobacterium* sp. type strains of species often used in probiotic products were tested on different agars. The tested strains included *B. adolescentis* DSM 20083 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Leibniz, Germany), *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140, *B. bifidum* DSM 20456, *B. breve* DSM 20213, *B. longum* ssp. *infantis* DSM 20088 and *B. longum* ssp. *longum* DSM 20219. The *B. bifidum* collection strains DSM 20082, DSM 20215 and DSM 20239 were also added for verification of the results.

Cultures of pure bifidobacterial strains grown anaerobically overnight were serially diluted and inoculated into Petri dishes which were immediately filled with tested agars, and cultivated in anaerobic atmosphere (AnaeroGen Compact System, Oxoid) at 37 °C for 2 days.

2.3. Enumeration of bifidobacteria in probiotic products

A total of 13 different human and animal probiotic supplements (lyophilized capsules, sachets and drops) commercially available in the European market (Table 2) were analysed. All the probiotic products were tested prior to the expiration date indicated on the labels of the product and were stored according to the manufacturer's recommendations.

One gramme or millilitre of each probiotic product was aseptically homogenised in 9 ml of sterile Saline peptone diluent (Oxoid) and serially diluted under anaerobic conditions (roll-tube technique; Hungate, 1969). The appropriate dilutions were transferred to sterile dishes and immediately filled with media listed in Table 1. All the probiotic

products were tested in triplicate. The plates were incubated as described in Section 2.2.

2.4. Evaluation of agar selectivity

Twenty colonies per each sample and media were selected for further confirmatory tests. Pure isolates were cultivated in Wilkins-Chalgren broth supplemented with soya peptone (5 g/l, Oxoid). Tests were conducted for morphology, Gram staining, and fructose-6-phosphate phosphoketolase (specific enzyme for Bifidobacteriaceae family) activity (F6PPK-test; Orban and Patterson, 2000) in order to confirm the selectivity of the MUP agar for bifidobacteria.

2.5. Statistical analyses

Bifidobacterial counts were converted to log₁₀ Colony Forming Unit (CFU) per g or ml. The results, based on triplicate analysis of probiotic bacteria in the selective media (TOS Mup, BSM Mup, and WSP Mup) were evaluated by multiple range comparison. Multiple range tests ($p < 0.001$) were performed using Statistica (Statistica 12.0, Tulsa, USA). The same statistical test was used to compare the growth of pure cultures in the tested media.

3. Results and discussion

All the tested pure cultures of bifidobacterial type strains were able to grow on all sets of tested media, in counts ranging from 5.78 to 10.25 log CFU/ml (Table 3), depending on the primary growth of individual strain in the enrichment media. All tested bifidobacterial type strains except for the type strain *B. bifidum* DSM 20456 showed similar counts on all three tested agars and no significant differences were found (Table 3). On the other hand, the type strain *B. bifidum* DSM 20456 showed a statistically significant lower increase in growth in TOS Mup medium, compared to WSP Mup and BSM Mup media. This increase was detected even in titrations where the order of magnitude of bacterial number was four times less. These results were verified by testing the three collection strains of *B. bifidum* (DSM 20082, DSM 20215 and DSM 20239). We observed that two of the collection strains (DSM 20082 and DSM 20215) showed growth on all tested media with identical counts (Table 3). However, the strain *B. bifidum* DSM 20239 again showed a statistically significant lower increase in TOS Mup media compared to WSP Mup and BSM Mup media. The lower counts of *B. bifidum* DSM 20456 and DSM 20239 may be due to the fact that these strains have limited abilities to utilize transgalactosylated oligosaccharides. TOS agar contains transgalactosylated oligosaccharides obtained by the transformation of lactose by the enzyme β -galactosidase, magnesium sulphate for enhancing recovery and growth of injured bifidobacteria, and sodium propionate as an inhibitor for other adjunct flora (Raeisi et al., 2013). These galacto-oligosaccharides as a specific substrate for bifidobacteria, however, cannot be specific to all bifidobacterial species. According to Miranda et al. (2014), the strain *B. animalis* ssp. *animalis* CIRMBIA 1335 also showed no colony forming in these media. Moreover, many physiological characteristics of bifidobacteria are species- or strain-specific.

Table 1
The media used for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products.

	Medium abbreviation	Medium name (producer)	Final concentration of additives
Mupirocin media (100 mg/l)	TOS Mup	TOS-propionate agar (Yakult Pharmaceutical Industry)	Acetic acid (final pH 6.3 + 0.2; at 25 °C)
	BSM Mup	Bifidobacteria selective medium (Fluka)	BSM supplement (0.116 g/l)
	WSP Mup	Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid)	Soya peptone (5 g/l) L-cysteine (0.5 g/l) Tween 80 (1 ml/l)

Table 2
Tested products and declared bacterial composition.

Product	Producer	Origin	<i>Bifidobacterium</i> strains	<i>Lactobacillus</i> and other strains
Super Dophilus	Pharma Agency, s.r.o.	Canada	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivariu</i> , <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
Probio-fix	S&D Pharma Ltd.	United Kingdom	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. acidophilus</i>
Infant Acidophilus	Swiss Herbal Remedies Ltd.	Canada	<i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i>
Biopron Junior	Valosun a.s.	Czech Republic	<i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>L. acidophilus</i>
Bifolac Balance	Bifodan A/S	Denmark	<i>B. longum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Apo-Baby Probio	Cell Biotech International A/S	Denmark	<i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilu</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Lactobene	Montefarmaco Milano for NTC S.r.l.	Italy	<i>B. bifidum</i>	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biform (drops)	Ferrosan SRL	Romania	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Apo-Lactobacillus 10+	Profarma-Produkt s.r.o.	Czech Republic	<i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilu</i> , <i>L. plantaru</i> , <i>L. fermentu</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>
GS Lactobacily FORTE 20	Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s.	Czech Republic	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. rhamnosu</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
BioLac Baby drops	Probiotech S.p.A.	Italy	<i>B. breve</i>	<i>L. plantarum</i>
Bio-Kult	Protexin®	United Kingdom	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricu</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salivariu</i> , <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilu</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
Doggy Care	Harmonium International Inc.	Canada	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Enterococcus faecium</i>

The presence of the genus *Bifidobacterium* was observed in all the tested probiotic products. The mupirocin media used were found to be fully selective, and all isolates were identified as bifidobacteria. The mupirocin antibiotic suppresses growth of lactobacilli, lactococci, leuconostocs, and streptococci without any inhibitory action towards bifidobacteria (Rada and Koc, 2000; Raeisi et al., 2013), which corresponds with our results.

Table 3
Results of bifidobacteria enumeration of pure culture and in tested products (\log_{10} CFU/g \pm SD).

Pure culture	BSM Mup	TOS Mup	WSP Mup
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ^a	8.63 \pm 0.2	8.71 \pm 0.03	8.64 \pm 0.02
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 ^a	8.84 \pm 0.05	8.88 \pm 0.01	8.87 \pm 0.01
<i>B. bifidum</i> DSM 20456 ^a	9.66 \pm 0.05	^d 5.78 \pm 0.11	9.56 \pm 0.05
<i>B. bifidum</i> DSM 20082 ^b	10.25 \pm 0.02	10.14 \pm 0.04	10.16 \pm 0.06
<i>B. bifidum</i> DSM 20215 ^b	10.05 \pm 0.03	9.91 \pm 0.05	9.96 \pm 0.03
<i>B. bifidum</i> DSM 20239 ^b	8.47 \pm 0.03	^d 6.76 \pm 0.03	8.60 \pm 0.13
<i>B. breve</i> DSM 20213 ^b	9.02 \pm 0.02	9.03 \pm 0.04	9.03 \pm 0.02
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSM 20088 ^a	8.44 \pm 0.03	8.38 \pm 0.01	8.37 \pm 0.04
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DSM 20219 ^a	6.83 \pm 0.02	6.78 \pm 0.01	6.85 \pm 0.02
Mean of strains	8.92 \pm 1.00	8.27 \pm 1.45	8.89 \pm 0.95
Product	BSM Mup	TOS Mup	WSP Mup
Apo-Lactobacillus 10+	8.58 \pm 0.00	8.85 \pm 0.01	8.53 \pm 0.02
Apo-Baby Probio	8.42 \pm 0.01	8.59 \pm 0.05	8.71 \pm 0.02
Biform (drops) ^c	5.03 \pm 0.02	5.23 \pm 0.05	5.04 \pm 0.01
Bifolac Balance	8.64 \pm 0.05	8.64 \pm 0.04	8.57 \pm 0.05
Bio-Kult	8.50 \pm 0.02	8.48 \pm 0.01	8.53 \pm 0.02
BioLac Baby drops ^c	9.34 \pm 0.02	9.38 \pm 0.01	9.35 \pm 0.01
Biopron Junior	9.20 \pm 0.02	9.17 \pm 0.04	9.20 \pm 0.04
GS Lactobacily Forte 20	8.47 \pm 0.01	8.19 \pm 0.02	8.12 \pm 0.03
Infant Acidophilus	9.32 \pm 0.02	9.58 \pm 0.01	9.43 \pm 0.07
Lactobene	7.19 \pm 0.02	7.33 \pm 0.03	7.19 \pm 0.03
Probio-fix	10.32 \pm 0.04	10.45 \pm 0.02	10.38 \pm 0.03
Super Dophilus	9.41 \pm 0.01	9.52 \pm 0.01	9.37 \pm 0.02
Doggy Care	10.05 \pm 0.04	10.07 \pm 0.02	10.08 \pm 0.02
Mean of products	8.53 \pm 1.30	8.61 \pm 1.29	8.54 \pm 1.32

Footnote: TOS: Transgalactosylated oligosaccharides propionate agar, BSM: Bifidobacteria selective medium, WSP: Wilkins-Chalgren anaerobe agar with soja peptone; Mup: mupirocin lithium salt (100 mg L⁻¹), DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH.

^a Type strain.

^b Collection strain.

^c \log_{10} CFU/ml \pm SD – drops.

^d Significant differences among bacterial counts in tested media $p < 0.001$.

No bacteria other than bifidobacteria were found growing on the selective agars supplemented with mupirocin (100 mg/l). The ISO/IDF (International Dairy Federation) standard states that the antibiotic mupirocin lithium salt (50 mg/l) inhibits the growth of most lactic acid bacteria commonly used in fermented and non-fermented dairy products. However, the 50 mg/l dosage was not found to be fully selective in our preliminary tests (data not shown). All tested agars supplemented with a mupirocin dose of 100 mg/l were found to be suitable for the selective enumeration of bifidobacteria in all types of probiotic products such as capsules, sachets and drops. The bifidobacterial colony counts of the individual products tested in our study did not significantly differ ($p < 0.001$; Table 3) between TOS Mup, BSM Mup, and WSP Mup.

The dose of ingested probiotic is an important factor impacting its concentration in the different parts of the gastrointestinal tract (Savard et al., 2011). Therefore, a standard acceptable level for probiotic bacteria may never be established, and it may not be possible to define the 'adequate numbers' referred to in the Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation definition (Raeisi et al., 2013). Also, according to Verna and Lucak (2010), the optimal number of CFU for each probiotic bacterial strain remains unknown. Doses of bacteria used for human trials are based on those tested during animal studies, despite the differences in intestinal surface area. An almost arbitrary dosage of 10⁹ probiotic bacteria per day appears to have been concluded as optimal, presumably based on the appearance of the probiotic organism in the faeces of the majority of human subjects when this daily dose is consumed (Tannock, 2003). As probiotics are live organisms, it is critical to accurately enumerate the population of viable microbes in the preparation and to provide this information to the consumer on the product label (Davis, 2014). Commercially available probiotic formulations typically have at least 10⁶ bacteria; however, they may carry up to 10¹² probiotic bacteria in 1 g. Therefore, product consumption should be controlled in order to achieve the minimal recommended dose of bacteria (10⁹ per day). The bifidobacterial counts in the tested probiotic products are reported in Table 3, and are observed to vary between 10⁵ and 10¹⁰ CFU/g. Only one product (Biform) contained less than 10⁶ CFU/ml of bifidobacteria. It was difficult to evaluate if the tested products contained sufficient numbers of bifidobacteria, as multispecies probiotic supplements do not declare the percentage of each bacterial species. This made it impossible to examine the total count of genus *Bifidobacterium*. The declared bacterial counts were equated to the amount in one capsule. However, as the weight of the capsule was not

reported, this complicated the setting of the control. Only four multispecies products (Super Dophilus, Infant Acidophilus, Apo-Baby Probio and Doggy Care) clearly declared the numbers of bifidobacteria, and our studies confirmed the specified values. The information supplied by the manufacturer is often not sufficient, and it is necessary to focus on the regulation and control of the probiotic market. The regulations regarding the identity of safe microorganisms are more definitive; as suggested by the European Food Safety Authority (2004), and Sanders (2009), the genus, species and strain of probiotic microorganisms should be clearly indicated on the label. Microbial analyses of probiotic products for human consumption have shown that the number and identity of the recovered species do not always correspond to those stated on the labels (Coeuret et al., 2004; Temmerman et al., 2003).

4. Conclusion

BSM and WSP media supplemented with mupirocin at a concentration of 100 mg/l were determined to be suitable for the selective enumeration of bifidobacteria in the various probiotic supplements tested using a colony count technique under anaerobic conditions. In addition, the data presented by the manufacturer on the packaging was often found to be insufficient for clear verification of the bifidobacterial number in the probiotic supplements.

Acknowledgements

This study was supported by grants GP14-31984P and GP14-31501P of the Grant Agency of the Czech Republic and CIGA 20132023 of the Grant Agency of Czech University of Life Sciences Prague.

References

- Ashraf, R., Shah, N.P., 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt – A review. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 194–208.
- Bunesová, V., Vlková, E., Rada, V., Ročková, Š., Svobodová, L., Jebavý, L., Kmet', V., 2012. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains isolated from dog faeces. *Vet. Microbiol.* 160, 501–505.
- Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J.P., 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 147–156.
- Davis, C., 2014. Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J. Microbiol. Methods* 103, 9–17.
- EFSA, 2004. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Colloquium on Microorganisms in Food and Feed: Qualified Presumption of Safety.
- Hungate, R., 1969. Chapter IV a roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 3, 117–132.
- ISO/IDF, 2010. Milk products-enumeration of presumptive bifidobacteria-colony count technique at 37 °C. ISO Standard 29981/IDF 220: 2010.
- Karimi, R., Mortazavian, A.M., Amiri-Rigi, A., 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food Microbiol.* 29, 1–9.
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., Ananta, E., 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J. Biotechnol.* 162, 356–365.
- Miranda, R.O., Neto, G.G., de Freitas, R., de Carvalho, A.F., Nero, L.A., 2011. Enumeration of bifidobacteria using Petrifilm (TM) AC in pure cultures and in a fermented milk manufactured with a commercial culture of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol.* 28, 1509–1513.
- Miranda, R.O., de Carvalho, A.F., Nero, L.A., 2014. Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin (RP-MUP) and assessment of its usage with Petrifilm™ Aerobic Count plates. *Food Microbiol.* 39, 96–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.010> (ISSN 0740-0020, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002013002311>).
- Orban, J.I., Patterson, J.A., 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods* 40, 221–224.
- Rada, V., Koc, J., 2000. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Milchwissenschaft* 55, 65–67.
- Raeisi, S.N., Ouoba, L.L.I., Farahmand, N., Sutherland, J., Ghoddusi, H.B., 2013. Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. *Food Control* 34, 691–697.
- Roy, D., 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 167–182.
- Saad, N., Delatre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Sci. Technol. LEB* 50, 1–16.
- Sanders, M.E., 2009. How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A guideline for consumers and health care professionals. *Funct. Food Rev.* 1, 3–12.
- Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M.-E., Thiboutot, H., Laurin, É., Roy, D., 2011. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 50–57.
- Tannock, G.W., 2003. Probiotics: time for a dose of realism. *Curr. Issue Intest. Microbiol.* 4, 33–42.
- Temmerman, R., Scheirlinck, I., Huys, G., Swings, J., 2003. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 220–226.
- Tripathi, M., Giri, S., 2014. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9, 225–241.
- Verna, E.C., Luca, S., 2010. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Ther. Adv. Gastroenterol.* 3, 307–319.

9.8 Příloha č. 8:

Anaerobe 34 (2015) 27–33

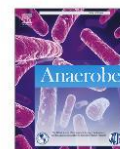


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe



Clinical microbiology

A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria



Eva Vlková*, Hana Salmonová, Věra Bunešová, Martina Geigerová, Vojtěch Rada, Šárka Musilová

Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague 6-Suchbát, 16521 Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2015
Received in revised form
23 March 2015
Accepted 2 April 2015
Available online 9 April 2015

Keywords:

Antibiotics
Bifidobacteria
Clostridia
Cultivation media
Mupirocin
Norfloxacin

ABSTRACT

Various culture media have been proposed for the isolation and selective enumeration of bifidobacteria. Mupirocin is widely used as a selective factor along with glacial acetic acid. TOS (transgalactosylated oligosaccharides) medium supplemented with mupirocin is recommended by the International Dairy Federation for the detection of bifidobacteria in fermented milk products. Mupirocin media with acetic acid are also reliable for intestinal samples in which bifidobacteria predominate. However, for complex samples containing more diverse microbiota, the selectivity of mupirocin media is limited. Resistance to mupirocin has been demonstrated by many anaerobic bacteria, especially clostridia. The objective was to identify an antibiotic that inhibits the growth of clostridia and allows the growth of bifidobacteria, and to use the identified substance to develop a selective cultivation medium for bifidobacteria. The susceptibility of bifidobacteria and clostridia to 12 antibiotics was tested on agar using the disk diffusion method. Only norfloxacin inhibited the growth of clostridia and did not affect the growth of bifidobacteria. Using both pure cultures and faecal samples from infants, adults, calves, lambs, and piglets, the optimal concentration of norfloxacin in solid cultivation media was determined to be 200 mg/L. Our results showed that solid medium containing norfloxacin (200 mg/L) in combination with mupirocin (100 mg/L) and glacial acetic acid (1 mL/L) is suitable for the enumeration and isolation of bifidobacteria from faecal samples of different origins.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The intestinal microbiota is a dynamic population containing a complex combination of microorganisms. Bifidobacteria, which are anaerobic, Gram-positive, acids producing, irregular bacilli, are one of important beneficial genera in gut microbiome of humans and other mammals, dominating especially during the milk-feeding period [1]. In recent years, the metabolism and mechanisms of the probiotic functions of bifidobacteria have been intensively studied [2], and the selection of new probiotic strains is of interest. To isolate bifidobacteria from complex populations such as the faecal microbiota, selective media that allow the growth of the bacteria of interest while inhibiting the growth of other microorganisms present in a sample should be employed. Several media have been developed for the selective enumeration and isolation of

bifidobacteria from different types of samples, and the use of some of these media was proposed for quality control analysis of dairy products containing probiotics [3,4].

Selective media for bifidobacteria are typically based on commercially available media such as Man, Rogosa, and Sharpe (MRS); Colombia; Reinforced Clostridial; and Wilkins–Chalgren agars, which are supplemented with different individual antimicrobial compounds or combinations of these compounds. In these media, the growth of non-bifidobacterial strains is usually inhibited by an antibiotic, low pH, or both [5]. Based on the recommendation of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, TPY (trypticase, phytone, yeast extract) medium supplemented with mupirocin (100 mg/L) should be used for the isolation of bifidobacteria. The main components of this medium (trypticase, phytone, and yeast extract) have proven to be satisfactory for the growth of bifidobacteria from all known habitats [6]. Mupirocin (50 mg/L) as a selective factor is also present in the medium intended for the enumeration of bifidobacteria in milk products also containing

* Corresponding author.
E-mail address: vlkova@af.czu.cz (E. Vlková).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.001>
1075-9964/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

lactic acid bacteria. The base of the medium is TOS agar (transgalactosylated oligosaccharides; Yakult, Japan). This medium has been recommended by the International Dairy Federation for the enumeration of bifidobacteria in dairy products, milk powders, infant formulas, and starter cultures [7]. Modified TPY medium (MTPY) supplemented with mupirocin (100 mg/L) and glacial acetic acid (1 mL/L) [8], was used for the enumeration of bifidobacteria in infant faecal samples by Vlková et al. [9], who showed that this medium was not effective for faecal samples from bifidobacteria-free infants with high numbers of clostridia, which were able to grow in the presence of mupirocin. Similar results were presented by Rada and Petr [8], who analysed hen caeca samples using the same medium and showed that about 5% of the colonies that grew were non-bifidobacterial. In addition, Lakshminarayanan et al. [10] reported that *Clostridium perfringens* was not inhibited by mupirocin in the dose 100 mg/L in MRS agar when the medium was used for the enumeration of bifidobacteria in faecal samples from elderly volunteers. Ferraris et al. [11] tested different media for the detection of bifidobacteria in faecal samples, and although Wilkins-Chalgren agar supplemented with mupirocin (50 mg/L) was determined to be the most selective medium, clostridia were isolated from 8 of the 15 samples tested.

The development of new selective media for the enumeration of bifidobacteria in intestinal samples may be considered unnecessary since culture-independent methods are used; however, selective media are essential for the isolation of new species. Although media designed for bifidobacteria determination are effective for samples in which only lactic acid bacteria are present along with bifidobacteria, the faecal microbiota is more complex and includes closely related genera that are difficult to separate. For intestinal samples in which bifidobacteria dominate, MTPY agar is reliable for their enumeration. However, mupirocin, even in combination with glacial acetic acid, does not suppress the growth of faecal clostridia. The objective was to find an antibiotic that inhibits the growth of clostridia and allows the growth of bifidobacteria, and to use this substance to develop a selective cultivation medium for bifidobacteria.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and cultivation media

Bifidobacteria and clostridia from human, calf, lamb, and pig faeces, and hen caeca were used in this study (Tables 1 and 2). The samples were collected from infants (parents of all babies sampled in this study gave informed written consent for the analysis of faecal samples) and adult volunteers. Animals used for the sampling were housed at the farm of the Czech University of Life Sciences Prague. The experiment was carried out under standard regime and farm management procedures and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Czech University of Life Sciences Prague). One gram of the sample was aseptically transferred to the tube containing oxygen-free Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) and serially diluted in the same medium. Bacteria were isolated using modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid, MWCHmup) supplemented with soya peptone (5 g/L, Oxoid), L-cysteine (0.5 g/L, Sigma), Tween[®] 80 (1 mL/L, Sigma–Aldrich), mupirocin (100 mg/L, Merck), and glacial acetic acid (1 mL/L) [8] after anaerobic cultivation at 37 °C for 3 days. Anaerobic jars (Anaerobic Plus System, Oxoid) were used for the anaerobic cultivation of plates. The jars were equipped with palladium catalysts (Oxoid) and filled with a CO₂/H₂ (10%/90%) atmosphere. After cultivation, bacterial colonies were picked and transferred to vials with Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) prepared by the Hungate technique [12]. This technique was used to prepare all liquid media used in this study. The morphology of the isolates was examined by

phase-contrast microscopy. Irregular rods were identified as bifidobacteria by the detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) activity [13]. Rods with regular morphology were classified as clostridia by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled probe specific for *Clostridium butyricum* (BioVisible, The Netherlands). Bifidobacteria of human origin were identified to the species level by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primers targeting the 16S rRNA gene [14] and isolates of animal origin were identified by sequencing the 16S rRNA gene according to the method of Killer et al. [15]. Control strains were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and the German Resource Centre for Biological Material (DSMZ).

Stock cultures of bifidobacteria were maintained at –70 °C in Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) containing glycerol (20% v/v). Clostridia were stored in cooked meat medium (Oxoid) at room temperature. Before the assay, bacteria were subcultured twice under anaerobic condition at 37 °C in Wilkins-Chalgren broth (Oxoid) for 24 h. Modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid, MWCH) without mupirocin and acetic acid supplementation was used for antimicrobial susceptibility testing.

2.2. Antimicrobial susceptibility testing

In the first step of this study, the sensitivity of 13 bifidobacterial and 13 clostridial strains (Table 1) to 12 antibiotics was tested. The following antibiotics with activity against Gram-positive anaerobic bacteria in standard concentrations for antibiotic susceptibility evaluation were chosen for the test: (i) cell wall synthesis inhibitors: glycopeptide – vancomycin (30 µg); cephalosporins – ceftazidime (30 µg), and cefoxitin (30 µg); (ii) protein synthesis inhibitors: monoxycarbolic acid – mupirocin (200 µg); aminoglycosides – apramycin (15 µg), kanamycin (30 µg), and neomycin (30 µg); and (iii) nucleic acid synthesis inhibitors: quinolones – ciprofloxacin (5 µg), flumequine (30 µg), and norfloxacin (10 µg); sulphonamide – sulfamethoxazole (25 µg); nitroimidazole – metronidazole (5 µg). Antibiotic discs (diameter = 6 mm) were obtained from Oxoid. An aliquot (1.5 mL) of each bacterial suspension containing 10⁷ cells per mL was used as the inoculum, and antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method on MWCH agar. Standard discs of the antimicrobial agents were placed onto the seeded plates and incubated anaerobically at 37 °C for 48 h. The diameter of the inhibition zones including the disk diameter was measured in millimetres, and the results were expressed as resistant (≤6 mm), moderately susceptible (6.1 mm–9.9 mm), or susceptible (≥10 mm). All antibiotics were tested in triplicate.

In the second step of this experiment norfloxacin and mupirocin were chosen for more detailed testing, because only norfloxacin inhibited the growth of all clostridia, and did not affect the growth of bifidobacteria, while mupirocin is a selective factor that is widely used in cultivation media for bifidobacteria. Another 74 bifidobacterial strains (11 collection strains, 19 strains from infants, 9 strains from adults, 10 strains from calves, 10 strains from lambs, 9 strains from hens, and 6 strains from pigs) and 62 clostridial strains (9 collection strains, 17 strains from infants, 14 strains from adults, 4 strains from calves, 9 strains from lambs, 3 strains from hens, and 6 strains from piglets) were tested for their sensitivity to norfloxacin and mupirocin by the disk-diffusion method as described above.

The minimal inhibitory concentration (MIC) of norfloxacin for the bacteria listed in Table 2 was determined. Overnight axenic cultures of bifidobacteria and clostridia were inoculated at about 1 × 10⁷ cfu into 10 mL of Wilkins-Chalgren broth supplemented with norfloxacin concentrations 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250, or 300 mg/L. Bacterial inhibition was also tested in the presence of

Table 1Susceptibility of bifidobacteria and clostridia to antibiotic determined by disk diffusion method (diameter of inhibition zones determined in triplicate in mm \pm SD, values include 6 mm of disk diameter).

Strain	CAZ30	CIP5	FOX30	K30	MTZ5	N30	NOR10	UB30	VA30
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSM 20104	17.00 \pm 0.65	9.00 \pm 0.65	17.67 \pm 1.16	R	R	R	R	R	17.67 \pm 0.58
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140	16.33 \pm 0.58	6.33 \pm 0.58	17.67 \pm 1.16	R	R	R	R	R	17.33 \pm 0.58
<i>B. breve</i> ATCC 15700	15.33 \pm 1.53	10.33 \pm 0.58	14.67 \pm 0.58	R	6.33 \pm 0.58	R	R	R	21.00 \pm 1.00
<i>B. longum</i> ATCC 15707	7.67 \pm 1.16	9.00 \pm 1.00	10.33 \pm 0.58	R	6.67 \pm 0.58	R	R	R	17.00 \pm 1.00
<i>B. adolescentis</i> 1	R	9.33 \pm 0.58	13.67 \pm 0.58	R	R	R	R	8.00 \pm 0.00	17.33 \pm 0.58
<i>B. bifidum</i> 1	17.00 \pm 1.00	10.33 \pm 0.58	23.33 \pm 0.58	R	10.67 \pm 0.58	R	R	R	21.67 \pm 0.58
<i>B. bifidum</i> 2	22.33 \pm 1.53	10.00 \pm 1.00	24.33 \pm 0.58	R	R	R	R	7.33 \pm 0.58	20.67 \pm 0.58
<i>B. breve</i> 1	19.33 \pm 0.58	11.33 \pm 0.58	12.33 \pm 0.58	R	R	R	R	R	23.33 \pm 0.58
<i>B. breve</i> 2	19.67 \pm 0.58	12.00 \pm 0.00	19.00 \pm 1.00	R	R	R	R	R	30.00 \pm 0.00
<i>B. dentium</i> 1	20.33 \pm 1.16	7.33 \pm 0.58	21.67 \pm 1.53	R	7.33 \pm 0.58	R	R	6.33 \pm 0.58	19.67 \pm 0.58
<i>B. pseudocatenulatum</i> 1	34.33 \pm 0.58	24.00 \pm 1.00	31.33 \pm 0.58	R	R	R	6.67 \pm 0.58	R	29.67 \pm 0.58
<i>B. longum</i> 1	23.33 \pm 0.58	11.33 \pm 0.58	20.00 \pm 0.00	R	R	R	R	R	24.67 \pm 0.58
<i>B. longum</i> 2	16.33 \pm 1.16	7.00 \pm 0.00	22.33 \pm 0.58	R	8.00 \pm 1.00	R	R	R	17.67 \pm 0.58
<i>Cl. tertium</i> DSM 2485	R	19.00 \pm 1.00	26.33 \pm 3.79	R	R	R	14.33 \pm 0.58	16.33 \pm 0.58	19.67 \pm 2.31
<i>Cl. clostridioforme</i> DSM 933	18.00 \pm 2.00	R	8.00 \pm 0.00	R	24.00 \pm 2.65	7.67 \pm 2.89	13.33 \pm 0.58	R	20.67 \pm 3.06
<i>Cl. butyricum</i> DSM 10702	R	23.00 \pm 0.00	22.00 \pm 0.00	R	33.67 \pm 0.58	8.00 \pm 0.00	19.67 \pm 0.58	21.00 \pm 0.00	23.00 \pm 0.00
<i>Cl. acetobutylicum</i> DSM 792	15.33 \pm 0.58	18.33 \pm 0.58	31.67 \pm 1.53	9.00 \pm 1.00	32.00 \pm 0.00	12.00 \pm 1.00	13.00 \pm 1.73	R	30.33 \pm 1.16
<i>Cl. perfringens</i> DSM 11778	20.00 \pm 1.00	14.00 \pm 0.00	21.33 \pm 0.58	R	11.67 \pm 1.16	R	13.67 \pm 2.08	13.33 \pm 1.53	19.00 \pm 0.00
<i>Cl. paraputrificum</i> DSM 2630	16.00 \pm 1.00	20.67 \pm 1.16	29.33 \pm 1.16	R	34.00 \pm 1.00	R	19.33 \pm 1.16	21.33 \pm 0.58	22.33 \pm 0.58
<i>Clostridium</i> spp. 1	R	19.67 \pm 0.58	20.00 \pm 1.73	R	28.00 \pm 2.00	R	17.00 \pm 0.00	17.67 \pm 1.53	24.67 \pm 0.58
<i>Clostridium</i> spp. 2	R	20.00 \pm 0.00	22.33 \pm 0.58	8.00 \pm 0.00	30.33 \pm 0.58	7.67 \pm 0.58	15.67 \pm 0.58	21.00 \pm 1.00	22.67 \pm 0.58
<i>Clostridium</i> spp. 3	R	25.00 \pm 0.00	22.00 \pm 2.00	7.33 \pm 0.58	40.00 \pm 0.00	7.00 \pm 0.00	20.00 \pm 1.00	25.33 \pm 0.58	26.33 \pm 0.58
<i>Clostridium</i> spp. 4	R	23.00 \pm 1.00	26.67 \pm 0.58	7.33 \pm 0.58	34.67 \pm 0.58	R	17.33 \pm 0.58	23.67 \pm 0.58	26.00 \pm 1.00
<i>Clostridium</i> spp. 5	R	20.00 \pm 0.00	25.00 \pm 1.00	9.33 \pm 0.58	32.33 \pm 1.16	7.00 \pm 0.00	16.33 \pm 0.58	20.67 \pm 0.58	24.00 \pm 0.00
<i>Clostridium</i> spp. 6	14.67 \pm 0.58	12.67 \pm 1.53	18.33 \pm 0.58	R	R	R	9.67 \pm 0.58	9.33 \pm 0.58	R
<i>Clostridium</i> spp. 7	R	10.67 \pm 1.53	11.67 \pm 0.58	7.33 \pm 1.16	R	7.33 \pm 1.16	8.67 \pm 0.58	R	15.00 \pm 2.65

SD: standard deviation; R: resistant bacteria without forming of inhibition zones; CAZ30: ceftazidime 30 μ g; CIP5: ciprofloxacin 5 μ g; FOX30: cefoxitin 30 μ g; K30: kanamycin 30 μ g; MTZ5: metronidazole 5 μ g; N30: neomycin 30 μ g; NOR10: norfloxacin 10 μ g; UB30: flumequine 30 μ g; VA30: vancomycin 30 μ g; ATCC: American Type Culture Collection; DSM: German Resource Centre for Biological Material.

both mupirocin (100 mg/L, common concentration in cultivation media for bifidobacteria) and norfloxacin (at different concentrations). All tests were performed in triplicates. The growth of the strains was identified as visible turbidity after anaerobic cultivation at 37 °C for 48 h. The MIC was defined as the lowest antibiotic concentration that completely inhibited bacterial growth.

2.3. Evaluation of norfloxacin as a selective factor in solid cultivation media for bifidobacteria

The selectivity of solid media containing norfloxacin was tested using pure bifidobacterial and clostridial strains (Table 3, Suppl. Table 1). Three variants of MWCH agar were prepared. The first variant had no added antibiotic, and served as a control (MWCH). The second variant contained mupirocin (100 mg/L) and glacial acetic acid (1 mL/L; MWCHmup). The third medium was supplemented with mupirocin (100 mg/L), glacial acetic acid (1 mL/L), and norfloxacin (at either 100, 150 or 200 mg/L; mupirocin, acetic acid, norfloxacin agar, MAN). A stock solution of the selective agents for addition to the MAN agar was prepared by diluting either 500, 750 or 1000 mg of norfloxacin (Sigma–Aldrich) and 500 mg of mupirocin (Merck) in 1 L of distilled water. To improve the solubility of norfloxacin and achieve the desired final acidity of the media, 5 mL/L glacial acetic acid was added. The stock solution was filter sterilized and added in appropriate amounts to media containing all the remaining components. The medium was autoclaved and cooled to 48 °C prior to adding the selective solution. Overnight pure bacterial cultures (Table 3, Suppl. Table 1) were serially diluted in Wilkins–Chalgren broth under anaerobic conditions, appropriate dilutions were transferred to sterile Petri dishes, and the tested agars were immediately poured in these dishes. The plates were incubated under anaerobic conditions at 37 °C for 3 days. The growth of all strains was tested in triplicates.

Bacterial growth and the selectivity of MAN were tested on both samples prepared *in vitro* and faecal samples of different origins. Sixteen variants of mock samples prepared in the laboratory contained mixtures of pure strains of bifidobacteria and clostridia (Suppl. Table 2); each strain was inoculated at 2.5×10^8 cfu, a concentration of bacteria equal to that usually present in faeces. Freshly collected faecal samples (1 g) from 5 vaginally delivered infants, 6 infants born by caesarean section (all babies were 1 month), 5 adults (aged from 20 to 48 years), 5 lambs, 10 calves, and 6 piglets (all young animals were 1 month old; Table 4) were aseptically transferred to tubes containing Wilkins–Chalgren broth (Oxoid) prepared by the Hungate technique and transported to the laboratory within 2 h. Both the *in vitro* and faecal samples were serially diluted in Wilkins–Chalgren broth under anaerobic conditions. The diluted samples were transferred to sterile Petri dishes, which were then immediately filled with MWCHmup or MAN agar. For this experiment, MAN agar contained norfloxacin at 200 mg/L, the dose that was determined to be optimal by previous tests. Plates were incubated anaerobically at 37 °C for 3 days. The selectivity of both media was evaluated by the genus-specific identification of isolates. After cultivation, colonies were counted, 6 colonies were picked from each faecal sample and 12 colonies were picked from each *in vitro* sample. Bacteria were sub-cultured and identified based on morphological characteristics using phase-contrast microscopy and the detection of F6PPK activity [13]. Regular, rod-shaped bacteria were hybridised with a FISH probe specific for *C. butyricum* as described above.

3. Results

3.1. Antibiotic sensitivity

Table 1 shows the results of the antibiotic susceptibility testing

Table 2
Minimal inhibition concentration (MIC) inhibiting growth of bifidobacteria and clostridia.

Strain	Origin	MIC (mg/L)	
		Norfloxacin	Norfloxacin together with mupirocin ^a
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSM 20104	DSM	>300	>300
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140	DSM	>300	>300
<i>B. breve</i> ATCC 15700	ATCC	>300	>300
<i>B. gallinarum</i> DSM 20670	DSM	>300	>300
<i>B. indicum</i> DSM 20214	DSM	>300	>300
<i>B. longum</i> ATCC 15707	ATCC	>300	>300
<i>B. pullorum</i> DSM 20433	DSM	>300	>300
<i>B. thermophilum</i> DSM 20210	DSM	>300	>300
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 1	Hen caeca	>300	>300
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 2	Calf faeces	>300	>300
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 3	Lamb faeces	>300	>300
<i>B. bifidum</i> 1	Infant faeces	>300	>300
<i>B. breve</i> 2	Infant faeces	>300	>300
<i>B. choerinum</i> 1	Pig faeces	>300	>300
<i>B. longum</i> 1	Infant faeces	>300	>300
<i>B. longum</i> 3	Adult faeces	>300	>300
<i>B. thermophilum</i>	Calf faeces	>300	>300
<i>Cl. tertium</i> DSM 2485	DSM	10	10
<i>Cl. clostridioforme</i> DSM 933	DSM	10	10
<i>Cl. butyricum</i> DSM 10702	DSM	10	10
<i>Cl. acetobutylicum</i> DSM 792	DSM	30	30
<i>Cl. perfringens</i> DSM 11778	DSM	10	10
<i>Cl. paraputrificum</i> DSM 2630	DSM	10	10
<i>Clostridium</i> spp. 2	Infant faeces	30	30
<i>Clostridium</i> spp. 3	Infant faeces	10	10
<i>Clostridium</i> spp. 5	Infant faeces	150	150
<i>Clostridium</i> spp. 6	Infant faeces	80	80
<i>Clostridium</i> spp. 10	Adult faeces	200	200
<i>Clostridium</i> spp. 12	Adult faeces	50	30
<i>Clostridium</i> spp. 36	Calf faeces	200	200
<i>Clostridium</i> spp. 38	Calf faeces	200	150
<i>Clostridium</i> spp. 39	Calf faeces	200	200
<i>Clostridium</i> spp. 42	Lamb faeces	150	150
<i>Clostridium</i> spp. 46	Lamb faeces	200	200
<i>Clostridium</i> spp. 47	Hen caeca	200	200
<i>Clostridium</i> spp. 49	Pig faeces	200	200
<i>Clostridium</i> spp. 50	Pig faeces	150	150

ATCC: American Type Culture Collection; DSM: German Resource Centre for Biological Material.

^a Mupirocin at concentration 100 mg/L.

on bifidobacterial and clostridial strains of human origin and collection strains. All tested bacteria were resistant to apramycin, mupirocin, and sulfamethoxazole, and no zone of inhibition were observed (data not shown). Almost all the tested bifidobacterial and clostridial strains were sensitive to ciprofloxacin, cefoxitin, and vancomycin with average inhibition zones of up to 31.33 mm in diameter. With one exception (*B. bifidum* 1), all bifidobacterial strains were resistant or moderately susceptible to kanamycin, metronidazole, neomycin, and flumequine, whereas the clostridial strains exhibited variable susceptibility. Almost all bifidobacteria were susceptible to ceftazidime, while 5 out of 13 clostridial strains were susceptible. Norfloxacin was the only antibiotic to which all tested clostridial strains were susceptible, or at least moderately susceptible, with average inhibition zones of 8.67–20.00 mm in diameter, and all bifidobacterial strains were resistant (only strain *B. pseudocatenulatum* 1 was moderately susceptible). Hence, norfloxacin was chosen for more detailed testing, together with mupirocin, which is a common component of the selective media for bifidobacteria.

Bifidobacteria and clostridia of different origins were screened for their sensitivity to norfloxacin and mupirocin. All bifidobacteria and most of the clostridia were resistant to mupirocin, a few clostridial strains were moderately susceptible and showed small inhibition zones (up to 8 mm in diameter). The majority of the bifidobacteria tested were resistant to norfloxacin. Only two human origin bifidobacterial strains (belonged to species *B. adolescentis*

and *B. bifidum*) of the 74 tested strains were sensitive to norfloxacin, with inhibition zones of 13.33 mm and 18.33 mm in diameter, respectively. Also other strains of species *B. adolescentis* (3 strains) and *B. bifidum* (6 strains) were tested in this study and were resistant to norfloxacin. Of the 62 strains of clostridia, 3 strains (2 of infant origin and 1 of adult origin) showed moderate susceptibility to norfloxacin. The remaining 59 clostridia were inhibited by norfloxacin, and average inhibition zones of 19.13 ± 3.11 mm in diameter were observed for the 9 collection strains. Human origin clostridial strains isolated from infant and adult faeces showed average inhibition zones with diameters of 17.41 ± 2.55 mm ($n = 15$) and 15.77 ± 3.17 mm ($n = 13$), respectively. For clostridia isolated from calves ($n = 4$), inhibition zones with an average diameter of 17.46 ± 3.42 mm were observed. Lamb-origin strains ($n = 9$) showed inhibition zones with a mean diameter of 14.89 ± 1.43 mm, and hen clostridia ($n = 3$) showed inhibition zones with a mean diameter of 15.67 ± 2.08 mm. Piglet strains ($n = 6$) were the most sensitive to norfloxacin, with average inhibition zones of 19.44 ± 4.60 mm in diameter.

The MICs of norfloxacin that inhibited clostridial growth in liquid media varied from 10 to 200 mg/L (Table 2). Similar results were obtained with the combination of norfloxacin and mupirocin (100 mg/L). Clostridia of human origin and clostridial strains from the culture collection showed greater susceptibility than the animal isolates. In contrast, bifidobacteria were resistant, and their growth was not influenced by norfloxacin at the concentration of 300 mg/L,

Table 3
Growth of bifidobacteria and clostridia on control (MWCH) and selective media (MWCHmup and MAN agars).

Strain	MWCH	MWCHmup	MAN
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSM 20104	8.47 ± 0.23	8.89 ± 0.41	8.53 ± 0.30
<i>B. breve</i> ATCC 15700	8.87 ± 0.04	8.80 ± 0.20	8.70 ± 0.14
<i>B. gallinarum</i> DSM 20670	8.75 ± 0.45	8.38 ± 0.16	8.72 ± 0.03
<i>B. longum</i> ATCC 15707	8.93 ± 0.17	8.81 ± 0.18	8.76 ± 0.23
<i>B. thermophilum</i> DSM 20210	8.77 ± 0.54	8.62 ± 0.36	8.69 ± 0.07
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 1	7.96 ± 0.26	7.79 ± 0.15	7.77 ± 0.18
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> 3	8.74 ± 0.09	8.81 ± 0.37	8.88 ± 0.33
<i>B. bifidum</i> 1	7.65 ± 0.28	7.55 ± 0.22	7.37 ± 0.19
<i>B. breve</i> 2	9.03 ± 0.47	8.97 ± 0.06	8.64 ± 0.08
<i>B. choerinum</i> 1	7.48 ± 0.17	7.53 ± 0.13	7.19 ± 0.29
<i>B. longum</i> 1	8.88 ± 0.21	8.59 ± 0.12	8.53 ± 0.25
<i>B. thermophilum</i>	8.69 ± 0.51	8.63 ± 0.04	8.62 ± 0.06
<i>Cl. clostridioforme</i> DSM 933	7.51 ± 0.16	7.47 ± 0.03	NG
<i>Cl. butyricum</i> DSM 10702	8.28 ± 0.43	8.60 ± 0.19	NG
<i>Cl. acetobutylicum</i> DSM 792	7.57 ± 0.09	7.69 ± 0.19	NG
<i>Cl. perfringens</i> DSM 11778	8.29 ± 0.15	8.36 ± 0.14	NG
<i>Clostridium</i> spp. 2	8.42 ± 0.31	8.21 ± 0.15	NG
<i>Clostridium</i> spp. 3	7.22 ± 0.05	7.05 ± 0.40	NG
<i>Clostridium</i> spp. 36	7.97 ± 0.27	8.19 ± 0.23	NG
<i>Clostridium</i> spp. 38	8.21 ± 0.13	8.40 ± 0.20	NG
<i>Clostridium</i> spp. 46	7.05 ± 0.47	7.57 ± 0.17	NG
<i>Clostridium</i> spp. 47	7.95 ± 0.06	7.79 ± 0.32	NG

The values are expressed as log cfu/mL (mean of 3 replicates ± SD).

For the strains origins see Table 2.

NG: not growth (counts lower than detection limit 2 log cfu/g); cfu: colony forming units; SD: standard deviation; MWCH: modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L, Oxoid), L-cystein (0.5 g/L, Sigma), Tween 80 (1 mL/L, Sigma), and glacial acetic acid (1 mL/L); MWCHmup: modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L, Oxoid), L-cystein (0.5 g/L, Sigma), Tween 80 (1 mL/L, Sigma), mupirocin (100 mg/L, Merck), and glacial acetic acid (1 mL/L); MAN agar: modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L, Oxoid), L-cystein (0.5 g/L, Sigma), Tween 80 (1 mL/L, Sigma), mupirocin (100 mg/L, Merck), glacial acetic acid (1 mL/L), and norfloxacin (200 mg/L, Sigma).

even in combination with mupirocin (Table 2). Clostridial growth was also tested in solid cultivation media (MAN agar) containing mupirocin, acetic acid, and different doses of norfloxacin (Suppl. Table 1). Eight out of 20 tested strains were inhibited by norfloxacin at 100 mg/L, 3 clostridial strains showed limited viability in the presence of 150 mg/L norfloxacin, and all strains were inhibited by the concentration of 200 mg/L norfloxacin. The MICs determined for cultivation in liquid media were consistent with those obtained for cultivation on MAN agar. Since all the tested clostridia were inhibited by norfloxacin at 200 mg/L, whilst bifidobacteria were not affected, this dose was determined to be optimal for the supplementation of MAN agar to enable the selective enumeration of bifidobacteria.

Table 4
Enumeration of bifidobacteria in faecal samples using selective agars and evaluation of agars selectivity.

Faecal sample origin	Number of samples	Bacterial counts (log cfu/g ± SD)		Number of isolates/F6PPK positive isolates (% of bifidobacteria)	
		MWCHmup agar	MAN agar	MWCHmup agar	MAN agar
Infants with bifidobacteria	5	9.86 ± 0.83	9.87 ± 0.86	30/28 (93)	30/30 (100)
Infants without bifidobacteria	6	8.06 ± 0.57	ND	36/0 (0)	0/0 (0)
Adults	5	9.33 ± 0.43	9.03 ± 0.88	30/25 (83)	30/29 (97)
Calves	10	9.01 ± 0.38	8.73 ± 0.66	60/40 (67)	60/58 (97)
Lambs	5	8.25 ± 1.37	7.57 ± 1.81	30/17 (57)	30/28 (93)
Piglets	6	8.13 ± 0.85	7.45 ± 1.11	36/17 (47)	36/35 (97)

ND: not detected (counts lower than detection limit 2 log cfu/g); cfu: colony forming units; SD: standard deviation; F6PPK: fructose-6-phosphate phosphoketolase; MWCHmup: modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L, Oxoid), L-cystein (0.5 g/L, Sigma), Tween 80 (1 mL/L, Sigma), mupirocin (100 mg/L, Merck), and glacial acetic acid (1 mL/L); MAN agar: modified Wilkins-Chalgren agar (Oxoid) supplemented with soya peptone (5 g/L, Oxoid), L-cystein (0.5 g/L, Sigma), Tween 80 (1 mL/L, Sigma), mupirocin (100 mg/L, Merck), glacial acetic acid (1 mL/L), and norfloxacin (200 mg/L, Sigma).

3.2. Evaluation of norfloxacin as a selective factor in the solid cultivation media for bifidobacteria

Pure strains of bifidobacteria and clostridia were tested for growth on three variants of modified Wilkins-Chalgren agar (Table 3). Bifidobacterial counts on MWCHmup and MAN agars were similar, and were nearly identical to those on the control MWCH without added selective factors. In addition, similar viability was observed for clostridia on media containing mupirocin and on MWCH agar; however, clostridial growth was inhibited on MAN agar, on which no visible colonies were detected (Table 3). The selectivity of MWCHmup and MAN agars was evaluated using mixtures of pure strains of bifidobacteria and clostridia in a 1:1 ratio (Suppl. Table 2). The average bacterial count determined on MWCHmup agar (8.72 ± 0.19 cfu) corresponded with the number of inoculated bacteria, and only 110 out of 192 isolates were identified as bifidobacteria. Much lower bacterial viability was observed after the cultivation of bacterial mixtures on MAN agar. The average count (8.35 ± 0.21 cfu) corresponded to half of the total number of inoculated bacteria. This medium showed very good selectivity and all the isolates were identified as bifidobacteria.

The selectivity of MAN agar for bifidobacteria was also compared with that of MWCHmup medium in faecal samples (Table 4). Faecal samples from 5 babies (all vaginally delivered infants) contained nearly 10¹⁰ cfu/g as determined by cultivation on both media. Although the MAN agar was selective, and only bifidobacteria were isolated, 2 non-bifidobacterial colonies were detected on MWCHmup media. In the faecal samples from 6 infants delivered by caesarean section, bacterial counts greater than 10⁸ cfu/g were observed on MWCHmup medium and all the bacteria isolated were identified as clostridia. In contrast, no visible colonies were detected on MAN medium. For faecal samples from both adults and animals, lower bacterial counts were detected on medium containing a combination of norfloxacin and mupirocin compared to those determined on MWCHmup agar. However, the selectivity of MAN medium was higher than that of agar containing mupirocin as a sole antibiotic. For all tested faecal samples, the percentage of F6PPK-positive isolates was higher on MAN agar, and the majority of these strains were identified as bifidobacteria (Table 4). Most of the F6PPK-negative bacteria isolated from MWCHmup were identified as clostridia by FISH. Clostridia were not detected on MAN agar, because all 6 strains without F6PPK activity that grew on this medium were classified as either Gram-positive cocci or Gram-negative regular rods.

4. Discussion

The selectivity of cultivation media for bifidobacteria isolation

from samples containing also clostridia is limited. Therefore, in this study, antibiotics with activity against Gram-positive anaerobic bacteria were examined to find a substance to which bifidobacteria are resistant and clostridia are susceptible. The tested bifidobacteria were resistant to aminoglycosides (apramycin, kanamycin, and neomycin), quinolones (flumequine and norfloxacin), metronidazole, and mupirocin, which has been reported as a general genus feature [6,16,17]. The moderate susceptibility to ciprofloxacin observed for the bifidobacteria examined in this study is in accordance with results obtained by Charteris et al. [18]. These authors reported resistance or moderate susceptibility to sulfamethoxazole in bifidobacteria of human origin. All strains tested in our study were resistant to sulfamethoxazole, as were the bifidobacteria examined by Masco et al. [19]. Some researchers have demonstrated susceptibility to ceftazidime, cefoxitin, and vancomycin [6,20,21] to be a general characteristic of bifidobacteria, which is in accordance with our findings. In contrast, Charteris et al. [18] reported resistance or moderate susceptibility of bifidobacteria to these antibiotics. This discrepancy may be because sensitivity to these antimicrobial agents is strain-specific or may be a result of the different assays used, since some substances diffuse poorly in agar medium [6].

Clostridia are usually resistant to aminoglycosides [22], and resistance to sulfamethoxazole has been described in *Clostridium difficile* [23], which we also observed in the strains we tested. All clostridia were resistant to apramycin, mupirocin, and sulfamethoxazole. Only small inhibition zones were observed around the kanamycin disk in some strains, and nearly all strains were resistant to neomycin. In general, variable resistance to cephalosporins has been observed in clostridia [22]. Of the cephalosporins tested in this study, clostridia were susceptible to cefoxitin and showed variable resistance to ceftazidime. Most of the strains were inhibited by quinolones (ciprofloxacin, flumequine, and norfloxacin), metronidazole, and vancomycin, and susceptibility to these antibiotics has been described in *C. difficile* strains [22]. The genus *Clostridium* includes heterogeneous species. Therefore, the antimicrobial patterns and features of strains differ between different clusters of clostridia. Using *in vitro* tests, Agnoletti et al. [24] demonstrated that norfloxacin is ineffective against *Clostridium spiroforme*, which causes enterotoxigenicosis in rabbits. Resistance to norfloxacin has also been described in *C. difficile* strains [25]. These two species are grouped in the XVIII and XI clusters, respectively, and share similar properties; however, they are different from *C. perfringens*, which is a member of cluster I [26] and is characterised as resistant to norfloxacin [27,28]. Norfloxacin has even been proposed as a selective factor in enrichment media for the detection of *C. difficile* in raw food of animal origin [29].

Norfloxacin was the only antimicrobial agent tested in this study to which all faecal clostridia were susceptible and most bifidobacteria were resistant. Therefore, norfloxacin was tested as a selective factor in cultivation media for bifidobacteria at a concentration of 200 mg/L, which was determined to be the optimal concentration. Although norfloxacin did not affect the growth of pure cultures of bifidobacteria, its anti-clostridial activity was conclusive, and the growth of the clostridial strains was inhibited. Similar results were obtained when analysing faecal samples. Although MAN agar was not completely selective, clostridial growth was suppressed, and all isolated F6PPK-negative bacteria were identified as Gram-positive cocci or Gram-negative rods. In contrast, nearly all non-bifidobacterial isolates from MWCHmup agar were identified as clostridia. In the faecal samples of infants delivered by caesarean section, more than 10^8 viable clostridial colonies were observed. These clostridia were reliably suppressed by norfloxacin, and no colonies of bacteria, even bifidobacteria, were detected on MAN

agar. Our results showed that the use of selective agars containing only mupirocin and acetic acid for bifidobacteria enumeration may lead to false results with respect to the presence of bifidobacteria. MWCHmup agar is particularly inappropriate for analysing faecal samples from newborn infants delivered by caesarean section, because a bifidobacteria-deficient microbiota is typical for these babies [30]. As we had predicted, when analysing faecal samples of vaginally delivered infants, the best selectivity was achieved by using both agars, because bifidobacteria are the dominant bacterial group in the intestinal microbiota of vaginally delivered breast-fed infants [1]. The lowest selectivity was observed when using MWCHmup agar for the cultivation of a piglet faecal microbiota, in which bifidobacteria do not dominate [31]. In this case, only 47% of the isolates were classified as bifidobacteria. Better results were achieved using MAN agar for piglet faecal samples, in which case 97% of the visible bacteria were found to belong to the genus *Bifidobacterium*. For all types of samples examined in this study, MAN agar was more effective for bifidobacteria isolation than MWCHmup agar, and the selectivity of these agar media was also dependent on the prevalence of bifidobacteria in the sample. Lower bifidobacterial counts and more complex intestinal microbiota are more typical in adults than in infants [1]. In addition, intestinal samples from calves and lambs have been shown to have more diverse microbial communities with lower bifidobacterial counts than vaginally delivered breast-fed infants [this study,32,33]. Norfloxacin has been reported to be ineffective against *C. difficile* strains [29]. Although pure cultures of these species were not tested in this study, we do not predict any major growth of *C. difficile* colonies on MAN media when analysing faeces, since this species is not predominant in the intestinal microbiota [26].

There are two basic problems to be considered when formulating cultivation media, one is the selectivity for the species of interest, and the second is that the media components must meet the nutritional requirements of the cultivated bacteria. Ferraris et al. [11] tested Wilkins–Chalgren agar containing 50 mg/L mupirocin and showed that this concentration was not sufficient for the elimination of faecal enterococci and clostridia. Moreover, Wilkins–Chalgren agar contains glucose as the sole carbon source, which might limit bifidobacterial growth, since some species do not utilise this sugar [8]. With respect to the nutritional requirements of bifidobacteria, TPY agar should preferably be used for their cultivation, because the soya peptone in the medium contains raffinose-series oligosaccharides (RSO). However, this medium is not commercially available; therefore, supplementation of Wilkins–Chalgren agar with soya peptone (5 g/L) seems to be the best way to meet the nutritional requirements of bifidobacterial species, because RSO can serve as a good carbon source [34]. Comparable growth of bifidobacteria has been demonstrated in both TPY broth and Wilkins–Chalgren broth supplemented with 5 g/L soya peptone [8].

5. Conclusion

Medium containing mupirocin and glacial acetic acid can be successfully used for the enumeration of bifidobacteria in faecal samples where these bacteria dominate. Media containing mupirocin as a single selective factor are also sufficient for dairy products containing bifidobacteria in combination with lactic acid bacteria, which are reliably suppressed by mupirocin. However, our results demonstrated that mupirocin and glacial acetic acid are not sufficient as selective factors for faecal samples with complex microbiota (e.g. human adult and animal intestinal samples), especially when clostridia are present. For these types of samples, mupirocin may be combined with norfloxacin at a concentration of 200 mg/L.

Acknowledgements

This study was supported by grant 14-31984P of the Grant Agency of the Czech Republic and CIGA 20132023 of the Grant Agency of Czech University of Life Sciences Prague.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.001>.

References

- [1] M. Ventura, F. Turroni, M. O'Connell Motherway, J. MacSharry, D. van Sinderen, Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria, *Trends Microbiol.* 20 (2012) 467–476.
- [2] M. Croni, M. Ventura, G.F. Fitzgerald, D. van Sinderen, Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria, *Int. J. Food Microbiol.* 149 (2011) 4–18.
- [3] R. Karimi, A.M. Mortazavian, A. Amiri-Rigi, Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese, *Food Microbiol.* 29 (2012) 1–9.
- [4] R.O. Miranda, A.F. de Carvalho, L.A. Nero, Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin (RP-MUP) and assessment of its usage with Petrifilm™ Aerobic Count plates, *Food Microbiol.* 39 (2014) 96–102.
- [5] R. Ashraf, N.P. Shah, Selective and differential enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt – a review, *Int. J. Food Microbiol.* 149 (2011) 194–208.
- [6] B. Biavati, P. Mattarelli, Genus *Bifidobacterium*, in: M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, et al. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second ed. The Actinobacteria, vol. 5, Springer, London, 2012, pp. 171–209.
- [7] ISO29981:2010: Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria – Colony count technique at 37 °C, 2.1.2010.
- [8] V. Rada, J. Petr, A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca, *J. Microbiol. Methods* 43 (2000) 127–132.
- [9] E. Vlková, J. Nevorál, B. Jenciková, J. Kopečný, J. Godefrooij, I. Trojanová, V. Rada, Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods, *J. Microbiol. Methods* 60 (2005) 365–373.
- [10] B. Lakshminarayanan, H.M.B. Harris, M. Coakley, O. O'Sullivan, C. Stanton, M. Pruteanu, et al., Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from the faecal microbiota of elderly Irish subjects, *J. Med. Microb.* 62 (2013) 457–466.
- [11] L. Ferraris, J. Aires, A.J. Waligora-Dupriet, M.J. Butel, New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces, *Anaerobe* 16 (2010) 469–471.
- [12] R.E. Hungate, A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes, in: R. Norris, D.W. Ribbons (Eds.), *Methods in Microbiology*, third ed., Academic Press, London, 1969, pp. 117–132.
- [13] J.I. Orban, J.A. Patterson, Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria, *J. Microbiol. Methods* 40 (2000) 221–224.
- [14] T. Matsuki, K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda, H. Oyaizu, Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4506–4512.
- [15] J. Křil, J. Kopečný, J. Mrázek, V. Rada, S. Dubná, M. Marounek, Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees, *Anaerobe* 16 (2010) 165–170.
- [16] M.S. Ammor, A.B. Flórez, B. Mayo, Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Food Microbiol.* 24 (2007) 559–570.
- [17] V. Rada, J. Koc, The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk product, *Milchwissenschaft* 55 (2000) 65–67.
- [18] W.P. Charteris, P.M. Kelly, L. Morelli, J.K. Collins, Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract, *Lett. Appl. Microbiol.* 26 (1998) 333–337.
- [19] L. Masco, K. Van Hoorde, E. De Brandt, J. Swings, G. Huys, Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products, *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2006) 85–94.
- [20] S. Delgado, A.B. Flórez, B. Mayo, Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract, *Curr. Microbiol.* 50 (2005) 202–207.
- [21] V. Mozzetti, F. Grattepanche, D. Moine, B. Berger, E. Rezzonico, F. Arigoni, et al., Transcriptome analysis and physiology of *Bifidobacterium longum* NCC2705 cells under continuous culture conditions, *Benef. Microbes* 3 (2012) 261–272.
- [22] A.B. Onderdong, S.D. Allen, *Clostridium*, in: P.R. Murray (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, sixth ed., ASM Press, Washington, 1995, pp. 574–586.
- [23] S.K. Niyogi, Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitalized patients with acute diarrhea, *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 10 (1992) 156–158.
- [24] F. Agnoletti, T. Ferro, A. Guolo, B. Marcon, M. Cochi, I. Drigo, et al., A survey of *Clostridium spiroforme* antimicrobial susceptibility in rabbit breeding, *Vet. Microbiol.* 136 (2009) 188–191.
- [25] C. Simango, S. Mwakurudza, *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility, *Int. J. Food Microbiol.* 124 (2008) 268–270.
- [26] F.A. Rainey, B.J. Hollen, A. Small, Genus *Clostridium*, in: P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, et al. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second ed. The Firmicutes, vol. 3, Springer, London, 2009, pp. 738–828.
- [27] H. Rahman, A. Chakraborty, T. Rahman, R. Sharma, B.R. Shome, I. Shakuntala, *Clostridial myonecrosis* clinically resembling black quarter in an Indian elephant (*Elephas maximus*), *Rev. Sci. Tech. – Off. Int. Epizoot.* 28 (2009) 1069–1075.
- [28] B.R. Shome, J.B. Songer, I. Shakuntala, R. Shome, A. Kumar, S. Chakraborty, et al., Atypical blackleg caused by *Clostridium perfringens* type A in cattle in Manipur, India, *Indian J. Anim. Sci.* 76 (2006) 353–357.
- [29] M. Jöbstl, S. Heuberger, A. Indra, R. Nef, J. Köfer, M. Wagner, *Clostridium difficile* in raw products of animal origin, *Int. J. Food Microb.* 138 (2010) 172–175.
- [30] M. Fallani, D. Young, J. Scott, E. Norin, S. Amarri, R. Adam, et al., Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51 (2010) 77–84.
- [31] F. Fava, M. Harri, H. Siljander-Rasi, H. Putaala, K. Tiihonen, J. Stowell, et al., Effect of polydextrose on intestinal microbes and immune functions in pigs, *Br. J. Nutr.* 98 (2007) 123–133.
- [32] E. Vlková, V. Rada, I. Trojanová, J. Křil, M. Smečilová, Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet, *Arch. Anim. Nutr.* 62 (2008) 359–365.
- [33] E. Vlková, M. Crmanová, V. Rada, I. Homutová, S. Dubná, Selection of probiotic bifidobacteria for lambs, *Czech J. Anim. Sci.* 54 (2009) 552–565.
- [34] V. Rada, J. Nevorál, I. Trojanová, E. Vlková, M. Smečilová, J. Křil, Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions, *Anaerobe* 14 (2008) 205–208.