

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Probiotika, huminové kyseliny a jejich význam
ve výživě psů**

Bakalářská práce

Kristýna Kříhová

Kynologie

Prof. MVDr. Eva Skřivanová Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Probiotika, huminové kyseliny a jejich význam ve výživě psů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.07.2020

Poděkování

Děkuji vedoucí své bakalářské práce prof. MVDr. Evě Skřivanové za vřelý přístup, podporu a cenné rady nejen ohledně vedení práce. Dále děkuji Ing. Adéle Palacké za ochotu, čas a entuziasmus, který mi při psaní mé práce dodávala. Poděkování patří taktéž kolektivu mikrobiologické laboratoře Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU v Praze), především Ing. Nikol Modráčkové, Ing. Romanu Švejtilovi a Ing. Ivaně Homutové. Dále bych velmi ráda a upřímně poděkovala mé rodině a přátelům za veškerou podporu, které se mi od nich dostává.

Probiotika, huminové kyseliny a jejich význam ve výživě psů

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá mikrobiotou trávicího traktu psa, jejím složením a možnostmi jejího ovlivnění pomocí probiotik a huminových kyselin. Celkem dvaceti psům byl po dobu čtrnácti dnů podáván dietární přídatek ve formě tablet obsahující bakterii *Enterococcus faecium*, inaktivované kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*, pivovarské kvasnice, řasu Chlorellu a huminovou kyselinu leonardit. Všem psům byl odebrán vzorek výkalu před a po skončení podávání. Získané vzorky byly podrobeny mikrobiologickému rozboru, při kterém byly sledovanými bakteriálními skupinami celkové počty koliformních bakterií, laktobacily, bifidobakterie, *Escherichia coli* a enterokoky. Kultivace byla provedena deskovou metodou. Narostlé kolonie byly spočítány a převedeny na jednotku log KTJ/g. Získané hodnoty byly porovnány a vyhodnoceny párovým t-testem pomocí programu STATISTICA 12. Na zvolené hladině pravděpodobnosti $\alpha \leq 0,05$ byl mezi prvním a druhým odběrem zjištěn statisticky významný rozdíl v hodnotách skupin bifidobakterií a enterokoků. Součástí testování dietárního přídatku bylo vyplnění dotazníku, které sledovalo chutnost samotného přídatku, vzhled výkalu po dobu podávání, množství vypité vody, změnu celkového stavu a vzhledu jedince, potřebu vyhledávat a pojídat větší množství trávy a reakci na přídatek v podobě zvracení. Nebyla zjištěna žádná závislost mezi podáváním přídatku a vzhledem exkrementu, množstvím vypité vody, potřebou vyhledávat a pojídat větší množství trávy ani zvracením jako reakci na přídatek. Z části dotazníku zaměřeného na chutnost a ochotu přijímání přídatku vyplynula vhodnost úpravy tablet do menších rozměrů nebo do formy prášku, neboť celých 45 % (9 jedinců) mělo potíže přídatek přijmout.

Klíčová slova: *Canis lupus familiaris*, mikrobiota, probiotika, *Enterococcus faecium*

Humic acids, probiotics and their role in dog nutrition

Summary

This bachelor's thesis deals with the microbiota of the dog's digestive tract, its composition and the possibilities of its influence by probiotics and humic acids. A total of twenty dogs were given a dietary supplement in the form of tablets containing *Enterococcus faecium*, inactivated yeast *Sacharomyces cerevisiae*, algae *Chlorella* and humic acid leonardite for fourteen days. A faecal sample was taken from all dogs before and after administration. The obtained samples were subjected to a microbiological analysis, in which the monitored bacterial groups were the total numbers of coliform bacteria, lactobacilli, bifidobacteria, *Escherichia coli* and enterococci. Cultivation was performed by the plate method. The grown colonies were counted and converted to log CFU/g. The obtained values were compared and evaluated by paired t-test using the STATISTICA 12 program. At the selected level of significance $\alpha \leq 0.05$, a statistically significant difference in the values of bifidobacteria and enterococcal groups was found between the first and second consumption. Part of the testing of the dietary supplement was the completion of a questionnaire that monitored the palatability of the supplement itself, the appearance of feces during administration, the amount of water consumed, changes in general condition and appearance, the need to seek out and eat more grass and the response to the supplement in the form of vomiting. No dependence was found between the administration of the supplement and the appearance of the excrement, the amount of water consumed, the need to seek out and eat more grass, or vomiting in response to the addition. The part of the questionnaire focused on the palatability and willingness to accept the addition showed the suitability of adjusting the tablets to smaller dimensions or in the form of a powder, because 45 % (9 individuals) had difficulty accepting the supplement.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, microbiota, probiotics, *Enterococcus faecium*

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
2.1 Hypotéza	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Pes domácí	10
3.1.1 Domestikační změny trávicího traktu	10
3.2 Mikrobiota trávicího traktu	10
3.2.1 Vznik mikrobioty trávicího traktu	11
3.2.2 Složení mikrobioty trávicího traktu	12
3.2.2.1 Druhové zastoupení.....	12
3.2.2.1.1 Žaludek.....	14
3.2.2.1.2 Tenké střevo	14
3.2.2.1.3 Tlusté střevo	14
3.2.2.1.4 Fekálie.....	14
3.3 Ovlivnění mikrobioty trávicího traktu	15
3.3.1 Nemoc	15
3.3.2 Antibiotika	16
3.3.3 Probiotika.....	17
3.3.3.1 Mikroorganismy používané jako probiotika ve výživě zvířat.....	17
3.3.3.2 Probiotika ve výživě psů	19
3.3.3.2.1 Lactobacily	19
3.3.3.2.2 Bifidobakterie.....	20
3.3.3.2.3 Enterokoky	20
3.3.4 Huminové kyseliny	20
4 Materiál a metody	22
4.1 Dotazník	22
4.1.1 Informace o psech	22
4.2 Stanovení počtů bakterií.....	22
4.3 Podávaný dietární přídavek.....	22
4.4 Odběr vzorku.....	22
4.5 Kultivace	23
4.6 Statistické vyhodnocení	24
5 Výsledky	25
5.1 Dotazník	25

5.1.1	Reakce na doplněk	25
5.1.2	Zvracení a vyhledávání trávy	25
5.1.3	Konzistence výkalu	25
5.1.4	Příjem vody	26
5.1.5	Celkový stav jedince	27
5.2	Vyhodnocení kultivace	28
5.2.1	První odběr	29
5.2.2	Druhý odběr	30
5.2.3	Třetí odběr	30
5.3	Statistické vyhodnocení	32
6	Diskuze	33
7	Závěr	36
8	Seznam literatury	37
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	45
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Mikrobiota je soubor mikrobiálních komunit zahrnujících bakterie, viry, archae, houby a prvoky (Suchodolski 2011). Nejpočetnější složku mikrobioty trávicího traktu psa tvoří bakterie (Clemente et al. 2012), přičemž v jednotlivých pasážích trávicího traktu dominují odlišné bakteriální skupiny (Suchodolski 2011). Diverzita a množství jednotlivých bakteriálních druhů hraje významnou roli v imunologických a fyziologických funkcích hostitele (Tannock 1995). Mikrobiota trávicího traktu je zakládána při porodu (Fiocchi et al. 2012; Barko et al. 2018) a v dospělosti dosahuje počtu 10^{12} – 10^{14} buněk (Suchodolski 2011). Narušení mikrobioty v období odstavu a přechodu na pevnou stravu může narušit odolnost jedince vůči chorobám (Buddington 2003). Zároveň je doložena závislost mezi počty bakterií mikrobioty trávicího traktu a nemocností psů (Zhang et al. 2015). Snížení počtů a/nebo diverzity bakteriálních komunit je pozorováno u psů se zánětlivým onemocněním střev (IBD), průjmami nebo alergiemi. Novodobé metody sekvenování DNA umožňují podrobné zkoumání bakteriálních komunit trávicího traktu a odhalují konkrétní rozdíly mezi složením u zdravých a nemocných psů. Tato skutečnost vede k pokusům o ovlivnění složení mikrobioty trávicího traktu pomocí různých technik.

Mezi nejčastější metody ovlivnění střevní mikrobioty patří aplikace probiotik (Pilla & Suchodolski 2020). Probiotika jsou živé mikroorganismy, které příznivě ovlivňují zdraví konzumenta, přičemž mechanismus účinku je obvykle druhově specifický. Jednotlivé bakteriální druhy mohou patogenům konkurovat například zvýšenou mírou přilnavosti ke sliznici střeva, schopností zvýšit přilnavost patogenů ke střevnímu hlenu (Collado et al. 2007a; Collado et al. 2007b), produkcí rozličných antibakteriálních látek (Jones & Versalovic 2009) a posílením imunitní odpovědi (Pagnini et al. 2010). Mezi nejčastější probiotika používaná ve výživě zvířat patří bakterie mléčného kvašení (laktobacily, enterokoky) a bifidobakterie (Markowiak & Ślizewska 2018).

Předmětem zvýšeného zájmu v oblasti výživy psů se stávají i ostatní dietární přísady ovlivňující zdraví jedince. Mezi takové látky lze řadit huminové kyseliny. Jedná se o organické látky vznikající humifikací (Svoboda 1983), mající výrazné antioxidační vlastnosti (Vašková et al. 2011). Zároveň se podílí na rozvoji imunity (Schuchmacher & Gropp 2000). Ve výživě lidí byl po podávání huminových kyselin zaznamenán nárůst bakterií střevní mikrobioty o 10 %. V chovech zvířat jsou nejčastěji používány k upravení schopnosti růstu (Schuhmacher & Gropp 2000; Avci et al 2007) a zvýšení snášky nosnic (Kucukersan et al. 2005).

2 Cíl práce

Cílem práce je vypracovat literární rešerši na téma významu huminových kyselin a probiotik ve výživě psů. V experimentální části je cílem stanovit vliv dietárního přídatku komerčního preparátu s obsahem huminových kyselin a probiotik na konzistenci exkrementů a jejich mikrobiologickou kvalitu.

2.1 Hypotéza

Dietární přídatek s obsahem huminových kyselin a probiotik má vliv na konzistenci výkalů a mikrobiologické parametry trávicího traktu psů.

3 Literární rešerše

3.1 Pes domácí

Říše: živočichové (*Animalia*)

Kmen: strunatci (*Chordata*)

Třída: savci (*Mamalia*)

Řád: šelmy (*Carnivora*)

Čeleď: psovití (*Canidae*)

Rod: vlk (*Canis*)

Druh: vlk obecný (*Canis lupus* Linnaeus, 1758)

Poddruh: pes domácí (*Canis lupus f. familiaris* Linnaeus, 1758)

Pro jedince řádu šelmy je typický úplný sekodontní chrup s velkými špičáky a výrazně zvětšenými trháky (Šterc & Štercová 2014). Horní čtvrtý premolár a dolní první molár tvoří tzv. trhákový komplex sloužící k lepšímu porcování kořisti (Wang & Tedford 2008). Dále jsou šelmy vybaveny mohutnými žvýkacími svaly. Dolní čelist je k horní připojena válcovitým kloubem, který umožňuje vyvinutí velkého tlaku v čelistech. Žaludek je jednoduchý, střevo krátké, slepé střevo je zakrnělé nebo chybí zcela.

Psovitě šelmy se řadí do skupiny fakultativních masožravců, kteří vedle potravy živočišné využívají též potravu rostlinnou (Šterc & Štercová 2014).

3.1.1 Domestikační změny trávicího traktu

V současné době je za společného předka všech psích plemen považován vlk obecný (*Canis lupus*) (Pang et al. 2009). Jak uvádí Thalmann et al. (2013), domestikace psa probíhala již před 32 000 lety, což z něj činí průkazně nejstarší domestikované zvíře.

V průběhu procesu domestikace nastaly změny v potravním chování i ve stavbě a funkci trávicí soustavy. Z anatomického hlediska má pes ve srovnání s vlkem slabší čelisti, menší zuby, méně objemný žaludek a delší střevo (Bradshaw 2006).

Domestikační změny se projevily i na enzymatické aktivitě trávicího traktu. Aktivita genů kódujících produkci dvou zásadních enzymů při trávení škrobů, konkrétně amylázy a maltázy, je u psa několikanásobně vyšší než u vlka. Tato skutečnost umožňuje dnešnímu psovi lépe využívat rostlinnou potravu a zároveň představuje menší potřebu živočišných složek (Axelsson et al 2013). I přes toto zjištění poukazuje Šterc a Štercová (2014) na velkou variabilitu psích plemen vyvíjejících se v odlišném prostředí, a tudíž uvažuje i jiné meziplenné nároky na poměr živočišné a rostlinné složky v potravě, kdy například plemena severská či plemena vzniklá křížením s vlkem mohou mít přirozeně vyšší nároky na obsah masa v krmné dávce.

3.2 Mikrobiota trávicího traktu

Vzhledem k rozdílným životním podmínkám se nachází odlišné mikrobiální komunity v dutině ústní (Nasidze et al. 2009), v plicích (Dickson et al. 2014), na kůži (Costello et al. 2009)

i v trávicím traktu (Qin et al. 2010). I přes to, že je povrch těla vystaven vnějšímu okolí, které obsahuje velké množství mikroorganismů, většina mikroorganismů celkové mikrobioty se nachází právě v trávicím ústrojí (Clemente et al. 2012). Nedávné molekulární studie odhalily, že gastrointestinální trakt savců obsahuje vysoce komplexní mikrobiotu, která zahrnuje bakterie, archaea, houby, prvoky a viry (Suchodolski 2011). Nejvíce početnou a metabolicky nejaktivnější skupinu mikrobioty trávicího traktu psa domácího tvoří bakterie (Swanson et al. 2011).

Současné metody sekvenování DNA umožňují studovat ucelenou analýzu souhrnných a rozmanitých střevních mikrobiálních komunit (Kwong et al. 2015). Zhang et al. (2015) uvádí, že tyto studie odkrývají úzké spojení mezi střevní mikrobiotou a zdravím hostitele. Již Tannock (1995) předkládá, že mikrobiota působí na fyziologické a imunologické funkce svého hostitele a výrazně tím ovlivňuje jeho zdraví. Jedná se kupříkladu o metabolickou funkci mikrobioty, potažmo produkci vitamínů, mastných kyselin s krátkým řetězcem (Suchodolski 2011), či přeměnu hostitelem nestravitelných částí potravy na stravitelné (Evrard et al. 1964). Dále se bakterie střeva podílí na vývoji morfologie trávicího traktu (Stappenbeck et al. 2002), rozvoji tkáně střeva (Suchodolski 2011) a celkovém metabolismu (Bäckhed et al. 2004). Liévin-Le Moal (2006) zmiňuje další přínos, a to mechanismus bariérového efektu proti proliferaci potenciálně patogenních bakterií a jejich adhezi na střevní sliznici obsazením těchto mikroorganismů a produkcí antimikrobiálních látek.

Dle Gras-Le Guen et al. (2015) vytváří střevní mikrobiota komplexní ekosystém, jehož utváření prochází kritickou periodou v průběhu prvních týdnů života a hraje důležitou roli v následném nastavení imunitního systému. Narušení počátečního procesu kolonizace mikrobioty může dlouhodobě ovlivnit zdravotní stav jedince.

3.2.1 Vznik mikrobioty trávicího traktu

Studie Jiménez et al. (2005) dokládají, že střevní mikrobiota u myší je zakládána již v děloze před narozením. Rautava et al. (2012) uvádí, že u člověka probíhá prvotní mikrobiální nastavení taktéž v děloze. Proti tomuto tvrzení se staví studie, která dokládá, že plod uvnitř dělohy matky je v podstatě sterilní a k zakládání mikrobioty dochází až při porodu (Fiocchi et al. 2012). Prozatím nebyla provedena žádná studie zabývající se kolonizací střevní mikrobioty psa domácího ještě před porodem, avšak myš, pes i člověk jsou savci a sdílejí stejné fyziologické a některé anatomické vzorce, a tudíž lze předpokládat podobnost (Grzeškowiak et al. 2015). Barko et al. (2018) předpokládají, že všichni savci jsou před porodem sterilní a bakterie jsou získávány až při porodu. Registrují sice záznamy naznačující vertikální přenos mikrobů z matky na plod před porodem, tyto studie však shledávají kontroverzními.

Jedinec porozený přirozeným způsobem, tj. vaginálně, je osidlován bakteriemi matky během porodu při průchodu porodním kanálem. Tyto bakterie jsou jak fekálního, tak vaginálního původu. Bakterie vaginálního původu mají nemalý vliv, neboť byla prokázána přítomnost bakterií mléčného kvašení v pochvě feny, a to především laktobacilů, které mají antipatogenní účinky a jsou používány jako probiotika (Delucchi et al. 2008).

Oproti tomu jedinec přivedený na svět sekci (tzv. „císařským řezem“) se nedostává do kontaktu s vaginálními ani fekálními mikroorganismy matky, a tak je prvotní kolonizace střeva

ovlivněna především prostředím porodu. Kromě osídlení při porodu získává jedinec bakterie také z mateřského mléka (Buddington 2003).

V období odstavu a přechodu na pevnou stravu prochází mikrobiální populace výraznou změnou, ať už jde o druhové zastoupení či počty. Zároveň jsou vykazovány obrovské rozdíly mezi jednotlivými psy (Schaible & Kaufmann 2005). Změny relativního podílu bakteriálních skupin spojené s věkem se časově shodují se změnami ve stravě a fyziologických procesech hostitele. Tyto změny mohou do budoucna ovlivnit výživový stav a odolnost psa vůči chorobám (Buddington 2003).

3.2.2 Složení mikrobioty trávicího traktu

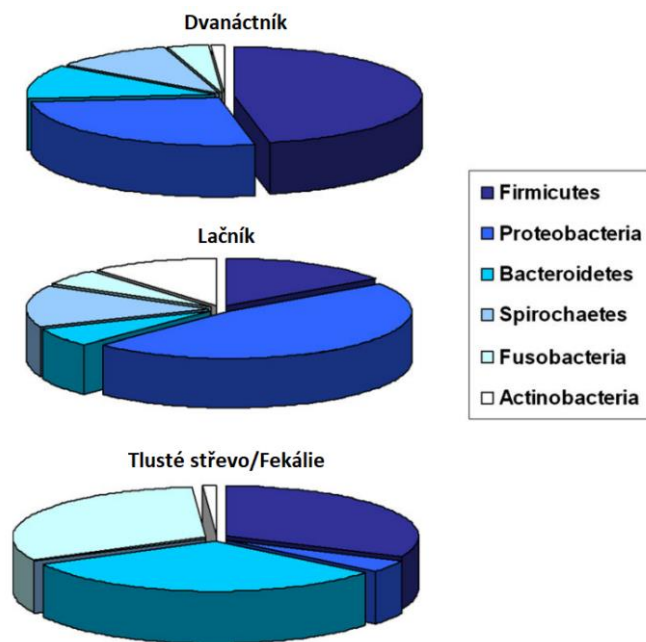
Zájem o složení střevní mikrobioty a možnost jejího terapeutického ovlivnění prudce rostl v posledních deseti letech. Díky tomuto zájmu a možnosti DNA sekvenování jsou k dispozici studie přinášející poměrně detailní informace o fyziologii a osídlení střevní mikrobioty psa domácího (Schmitz & Suchodolski 2016).

Na složení střevní mikrobioty mají vliv mimo jiné sliny, pH žaludeční kyseliny, žluč, pankreatická šťáva a motilita střev (Lata & Juránková 2011). Dále Lata a Juránková (2011) uvádí důležitost regenerační schopnosti buněk střevní sliznice a tzv. kolonizační rezistenci střevní mikrobioty, která zabráňuje proniknutí patogenních látek a organismů, případně nežádoucí organismy inhibuje. Věkem, potažmo stárnutím, dochází k poklesu sekrece slin, střevní motility i schopnosti obnovy slizničních buněk. Simpson et al. (2002) poukazují na skutečnost, že ve složení střevní i fekální mikrobioty hraje jistou roli i plemenná příslušnost. Mezi vnější faktory ovlivňující druhové složení lze zařadit výživu, příjem specifických dietárních složek ve formě krmných aditiv, prostředí, ve kterém se jedinec nachází (Geigerová et al. 2014) a stres. Důležitým vlivem je také nemoc a případná léčba s touto nemocí spojená (Lata & Juránková 2011).

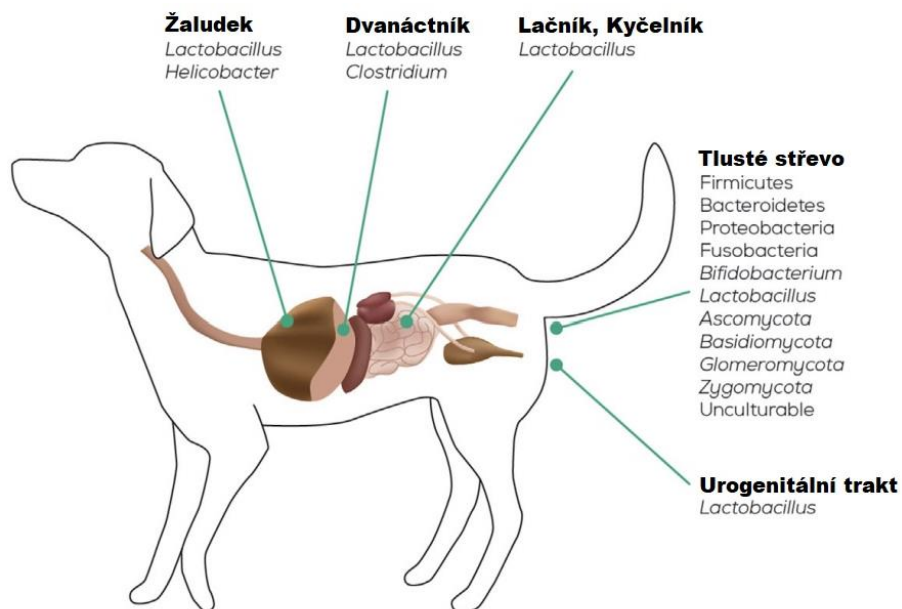
3.2.2.1 Druhové zastoupení

Dle odhadů je druhová skladba mikrobiálního společenství trávicího traktu psa velmi pestrá a pohybuje se mezi 500–1000 druhy (Xu & Gordon 2003). Suchodolski (2011) odhaduje, že střevní mikrobiota obsahuje 10^{12} – 10^{14} mikrobiálních buněk. Molekulární metody dokázaly, že každý pes má individuální složení mikrobioty a zároveň, že je toto složení druhově přirozeně poměrně neměnné (Simpson et al. 2002). Genový soubor těchto mikrobů je označován jako střevní mikrobiom.

Rozdělení typických bakteriálních kmenů v jednotlivých pasážích trávicího traktu psa domácího znázorňuje Obrázek 1. Ačkoliv je celkové množství a složení neměnné, v rámci trávicího traktu se počty a pestrost bakteriálních druhů zvyšuje aborálně po celé délce trávicího traktu (viz Obrázek 2) (Suchodolski et al. 2008).



Obrázek 1: Rozdělení typických bakteriálních kmenů v trávicím traktu psa (dle Schmitz & Suchodolski 2016)



Obrázek 2: Pevládající mikroorganismy v gastrointestinálním traktu psa (dle Grzeškowiak et al. 2015)

3.2.2.1.1 Žaludek

Celkový objem bakterií vyskytujících se v žaludku se pohybuje v rozmezí 10^1 – 10^6 KTJ/g (Suchodolski 2011) a je osídlen převážně *Proteobacteria* (99,6 %) s doplněním *Firmicutes* (0,3 %) (Garcia-Mazcorro et al. 2012). Převládajícími druhy jsou zde *Helicobacter* (příčemž druh *Helicobacter pylori* je orálně přenosný na člověka a kolonizace sliznice žaludku bývá doprovázena vznikem gastritidy (Bureš et al. 2002)) a *Lactobacillus* spp. (Schmitz & Suchodolski 2016).

3.2.2.1.2 Tenké střevo

Počet bakterií dvanáctníku u většiny psů nepřesahuje 10^3 KTJ/g, avšak u některých jedinců mohou hodnoty výjimečně nabývat až 10^9 KTJ/g (Suchodolski 2011). Studie Xenoulis et al. (2008) uvádí, že u zdravého psa je dvanáctník osídlen šesti hlavními kmeny, a to *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria* a *Actinobacteria*. Dominantní třídou je zde *Clostridium* (kmen *Fusobacteria*) (Suchodolski et al. 2008).

Studie Suchodolski et al. (2009) se zabývá lačníkem zdravého psa a vyhodnocuje *Proteobacteria* jako převažující kmen, následován *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Fusobacteria*. Počty bakterií lačníku a kyčelníku jsou konstatně vyšší a to průměrně 10^7 KTJ/g. Současné možnosti sekvenování DNA dokládají průměrně 200 bakteriálních druhů a 900 bakteriálních kmenů osidlujících lačník psa domácího (Handl et al. 2011).

Kyčelník je osídlen převážně *Clostridia*, *Fusobacteria* a *Bacteroides* (Suchodolski et al. 2008).

3.2.2.1.3 Tlusté střevo

V tlustém střevě nabývají bakteriální počty ještě vyšších hodnot a to 10^9 – 10^{11} KTJ/g (Suchodolski et al. 2009). Zkoumané vzorky tlustého střeva vykazují dominanci kmenů *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Suchodolski et al. 2008).

Převládající skupiny organismů osidlující střevo jsou *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp. a *Enterobacteriaceae* (Suchodolski 2011).

3.2.2.1.4 Fekálie

Výsledky analýz fekální mikrobioty indikují dominanci kmene *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* (převážně *Clostridiales*), *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Xenoulis et al. 2008; Suchodolski et al. 2009; Garcia-Mazcorro et al. 2012). Studie Handl et al. (2011) zkoumající fekální mikrobiotu psa vyhodnocuje *Firmicutes* jako dominantní kmen v psích výkalech, převládající třídou je zde *Clostridia*, rod *Ruminococcus*. Mimo jiné bylo určeno 17 druhů bakterií mléčného kvašení a 8 druhů *Bifidobacterium* spp.

3.3 Ovlivnění mikrobioty trávicího traktu

3.3.1 Nemoc

German et al. (2003) nenachází korelaci mezi zvýšenými počty bakterií dvanáctníku a nemocností psů. Toto tvrzení rozporuje nejen studie Zhang et al. (2015) jež sděluje, že v případě patologického složení mikrobů ve střevě může být tato skutečnost faktorem vzniku poruch trávicího ústrojí, včetně vzniku chronických střevních zánětů (IBD). U psů je rozpoznáno několik potencionálních patogenů, a to *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *E. coli* a *Campylobacter jejuni* (Marks et al. 2002). Dle Viswanathan et al. (2009) může invaze a/nebo kolonizace specifickými patogeny výrazně narušit integritu střevní epiteliální bariéry. Suchodolski (2011) uvádí, že dysbióza tenkého střeva může být způsobena selháním kontrolních mechanismů regulujících počty bakterií. Tyto mechanismy zahrnují střevní motilitu a přítomnost antimikrobiálních látek v sekretech slinivky a žlučníku. Již Simpson (1990) dokumentuje změny složení střevní mikrobioty při exokrinní pankreatické insuficienci. Narušení složení střevní mikrobioty může vést též ke vzniku alergií (Lee & Hase 2014).

Jiné klinické a experimentální studie dokládají, že relativní rovnováha složení agresivních a ochranných druhů se mění u IBD (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, pouchitida). Xenoulis et al. (2008) endoskopicky odebírají a následně analyzují kartáčový lem dvanáctníku a poukazují na výrazně sníženou pestrost bakteriálních druhů a vyšší zastoupení *Enterobacteriaceae* u psů s IBD oproti psům zdravým. Analýza fekálních vzorků psů s IBD odhalila výrazně sníženou bakteriální diverzitu, zvýšené počty *Gammaproteobacteria* (tj. *E. Coli*) a snížení počtů *Erysipelotrichia*, *Clostridia* a *Bacteroidia* (Minamoto et al. 2014). Hypotézu, že změny v mikrobiotě mohou inhibovat nebo usnadnit procesy nemoci, včetně IBD, sdílí ve své studii i Bell et al. (2008).

Bell et al. (2008) dále předkládají, že psi mají stabilní složení mikrobiální komunity tlustého střeva a že epizody průjmu vedou k dlouhodobým změnám ve složení a/nebo funkci těchto komunit. Kromě toho uvádí, že léčba specifických patogenů může tento efekt zesílit. Minamoto et al. (2014) uvádí zvýšené počty *Clostridium* spp. (především *C. perfringens*), *E. coli*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* spp. a *Bifidobacterium* spp. za současného snížení *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae*, *Blautia* spp. a *Fusobacteria* u jedinců s průjmem v porovnání se zdravými psy. Suchodolski et al. (2012) ve své studii popisují u psů s akutním průjmem silnou dysbiozu spolu se snížením počtu bakterií produkujících mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako je *Blautia* spp., *Ruminococcus* spp., *Faecalibacterium peanitzi* a *Turicibacter* spp. Guard et al. (2019) pozorují u psů s akutním průjmem zvýšené počty rodu *Clostridium*. Pilla a Suchodolski (2020) zdůrazňují, že střevní dysbióza nemění pouze fekální profily mastných kyselin s krátkým řetězcem, ale také metabolity krve a moči, což naznačuje, že akutní epizody průjmu mají vliv na celkový metabolický profil hostitele. Dále zmiňují, že dysbioza může být spíše příznakem chorobného procesu nežli jeho příčinou.

Odhalování rozdílů ve složení mikrobioty trávicího traktu mezi zdravými a nemocnými psy vede k závěru, že cílená modifikace těchto mikrobiálních komunit může mít za určitých okolností příznivý účinek na zdraví hostitele (Schmitz & Suchodolski 2016). Mezi časté metody manipulace mikrobioty patří aplikace antibiotik, probiotik či fekálních implantátů. Tyto metody

působí buď odstraněním škodlivých bakterií nebo prosazením bakterií prospěšných. (Pilla & Suchodolski 2020).

3.3.2 Antibiotika

Antibiotikum je látka, která brání růstu nebo usmrcuje některé mikroorganismy. Dříve byl termín antibiotika používán výhradně pro látky přírodního původu, tj. produkovanými bakteriemi a houbami. Pro látky syntetického původu stejných účinků byl používán termín chemoterapeutika. Dnes je pojem antibiotika používán souhrně pro látky s baktericidním či bakteriostatickým účinkem bez ohledu na jejich původ (Votava 2001).

Jak uvádí Geigerová et al. (2014), antibiotika jsou běžnou součástí veterinární medicíny. Upozorňují však, že jejich užívání je relativně významným faktorem v ovlivňování střevní mikrobioty a může vést k negativním změnám v jejím složení. Pilla a Suchodolski (2020) podotýkají, že antibiotika jsou používána při akutních i chronických gastrointestinálních obtížích s cílem odstranit patogenní bakterie i přesto, že antibiotika způsobují výrazné změny ve střevní mikrobiotě a jejich užívání není často odůvodněné. Unterer et al. (2011) nenachází rozdíl mezi skupinou léčenou antibiotiky a placebo skupinou v míře úmrtnosti, délce hospitalizace ani závažnosti klinických příznaků u klinické studie zabývající se psy s akutním krvácivým průjmem. Akutní průjmy jsou často léčeny antibiotiky, studie Jergens et al. (2010) však nenachází žádné rozdíly v zotavení psů s IBD, kterým byl podáván metronidazol a prednison a těmi, kteří dostávali pouze prednison.

Tylosin a metronidazol jsou běžně užívaná antibiotika při onemocněním zažívacího traktu a mají výrazný dopad na střevní mikrobiom (Pilla & Suchodolski 2020). Metronidazol je nitroimidazolové antibiotikum s antiprotozoálními vlastnostmi, které se běžně používá u malých zvířat s akutními a chronickými gastrointestinálními poruchami (Barko et al. 2018). V několika studiích zaměřených na osoby trpící Crohnovou chorobou bylo podávání metronidazolu spojeno s remisí této nemoci. Studie Igarashi et al. (2014) na zdravých psech odhalila, že metronidazol snižuje fekální bakteriální diverzitu, zároveň však snižuje podíl patogenních bakterií jako *Fusobacterium* a zvyšuje podíl domněle prospěšných bakterií, například *Bifidobacterium*. Tylosin, makrolidové antibiotikum, je obvykle používáno k léčbě chronických enteropatií u psů (Barko et al. 2018). Suchodolski et al. (2009) popisují redukcii bakteriální diverzity tenkého střeva při podávání antibiotika tylosin zdravým psům. Dále pozorují zvýšené počty *Enterococcus*. Užívání tylosinu způsobilo také nárůst potencionálně patogenních bakterií jako jsou *C. perfingens*, *E. coli* a *Pasteurella*. I přes změny ve složení mikrobioty nebyla tato skutečnost doprovázena žádnými viditelnými klinickými projevy.

Užívání antibiotik může vyvolat střevní dysbiozu, přičemž širokospektrá antibiotika způsobují rychlý a významný pokles taxonomického bohatství, rozmanitosti a vyrovnanosti střevních bakteriálních komunit. Jakmile je léčba antibiotiky přerušena, mnoho bakteriálních druhů se zotaví, plný návrat k původní kompozici je ale zřídka kdy dosažen. Vzhledem k těmto zjištěným poznatkům se předmětem zájmu stávají probiotika, prebiotika a synbiotika (Pilla & Suchodolski 2020).

3.3.3 Probiotika

Dle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světové zdravotnické organizace (WHO) (2002) jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy, které jsou zdraví prospěšné při konzumaci v dostatečném množství. Podávání probiotik je jednou z možností manipulace s mikrobiotou (Geigerová et al. 2014). Schmitz a Suchdolski (2016) podotýkají, že v mnohých případech je termín probiotika používán pro určité mikroorganismy i přesto, že jejich zdravotní přínos nebyl prokázán. Navrhuje proto probiotika popisovat jako mikroorganismy, které jsou hostiteli podávány za účelem zlepšení jeho zdraví. Pilla a Suchodolski (2020) zmiňují, že probiotika obvykle nejsou schopna kolonizovat střevo kvůli konkurenci zavedené mikrobioty. Avšak probiotika mohou mít pozitivní vliv skrze produkci metabolitů a antimikrobiálních peptidů, které mohou modifikovat složení lokální mikrobioty a interreagovat s imunitním systémem (Schmitz & Suchodolski 2016).

Účinnost probiotik je kmenově specifická a každý kmen může přispívat ke zdraví hostitele rozdílnými mechanismy. Některá probiotika (například *Lactobacillus rhamnosus*) mohou potencionálním patogenům konkurovat zvýšenou mírou přilnavosti ke sliznici střeva, jiné kmeny mají naopak schopnost zvýšit přilnavost patogenů ke střevnímu hlenu (Collado et al. 2007a; Collado et al. 2007b). Mezi další mechanismy účinku patří například produkce různých antimikrobiálních látek (Jones & Versalovic 2009) a posílení imunitní odpovědi (Pagnini et al. 2010). Působení probiotik může mít tedy pozitivní vliv na adhezi patogenů, mikrobiální metabolismus, stimulaci imunity (Sarowska et al. 2013), zvládání stresu, podporu růstu, alergické reakce i obezitu (Grześkowiak et al. 2015).

K podpoře probiotických i vlastních bakterií mohou být podávána prebiotika (Geigerová et al. 2014). Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují hostitele tím, že selektivně stimulují růst a/nebo aktivitu jednoho či více bakteriálních druhů již se ve střevě vyskytujících (Gibson et al. 2010). Kombinace probiotik a prebiotik se nazývá synbiotika (Pinna & Biagi 2014).

3.3.3.1 Mikroorganismy používané jako probiotika ve výživě zvířat

V minulosti i dnes patří mezi nejčastěji používané probiotické mikroorganismy bakterie mléčného kvašení, a to především rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. Ostatními probiotickými mikroorganismy jsou bakteriální rody a druhy (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium butyricum*, *Propionibacterium*), ale i kvasinky (*Sacharomyces cerevisiae*) nebo plísně (*Aspergillus oryzae*) (Rada 2010). Nejčastěji používané mikroorganismy ve výživě zvířat dle Markowiak & Ślizewska (2018) jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Mikroorganismy používané jako probiotika ve výživě zvířat (dle Markowiak & Ślizewska 2018)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. murinus</i> <i>L. gallinarium</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. pentosus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>B. longum</i> <i>B. pseudolongum</i> <i>B. thermophilum</i>
Ostatní bakterie mléčného kvašení	<i>Enterococcus faecialis</i> <i>E. faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Leu. lactis</i> <i>Leu. mesenteroides</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>Sporolactobacillus inulinus</i> <i>Streptococcus infantarius</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i>
Ostatní mikroorganismy	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>A. niger</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bac. licheniformis</i> <i>Bac. subtilis</i> <i>Propionibacterium Freudenreichi</i> <i>Saccharomyces cerevisiae (boulardi)</i> <i>Sach. pastorianus</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>K. marxianus</i>

3.3.3.2 Probiotika ve výživě psů

K roku 2016 byla Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) zkoumána bezpečnost a účinnost produktů s obsahem čtyř bakteriálních kmenů (*Enterococcus faecium* NCIMB 10415 E1705, *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 E1707, *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 25 a *Bifidobacterium sp. animalis*) při použití jako probiotik či dietárních přísad pro psy. Dva produkty obsahující *E. faecium* byly shledány prospěšnými a byly schváleny. U produktů obsahujících *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis* nedošla EFSA k závěru potvrzující jejich účinnost. I přesto, že většina výrobků používaných v Evropě obsahuje výše zmíněný *E. faecium* NCIMB 10415 E1707, samotné výrobky obsahující obvykle i další bakteriální kmeny či různá prebiotika nebývají speciálně testovány ani schvalovány (Schmitz & Suchodolski 2016).

U psů trpících IBD bývá ke klasické imunosupresivní léčbě doporučována podpůrná léčba probiotiky (Pilla & Suchodolski, 2020). Ve studii White et al. (2017) byli psi s IBD náhodně vybráni ke standardní léčbě s probiotiky a bez probiotik. Obě léčby modulovaly počet slizničních bakterií v adherentním hlenu. Zároveň byly spojeny s rychlou klinickou remisí, navzdory nulovému snížení histopatologického zánětu. Zajímavé je, že pouze psi dostávající probiotika měli zvýšenou expresi proteinů těsného buněčného spoje. Toto zjištění naznačuje, že i přes nedostatečnou schopnost kolonizace mohou mít probiotika blahodárné účinky na homeostázu sliznic. Studie Rossi et al. (2014) zabývající se psy s IBD shledává kombinovanou léčbu (prednison, metronidazol, probiotika) úspěšnou alternativou k léčbě prednisonem a metronidazolem samotnými. Hlavní klinické příznaky vymizely rychleji u skupiny léčené standardní léčbou, nicméně qPCR střevního mikrobiomu 30 dní po ukončení léčby ukázalo návrat hojnosti *Faecalibacterium* spp. pouze u skupiny dostávající probiotika. Pro jiné bakteriální skupiny nebyly viditelné žádné významné změny.

3.3.3.2.1 Lactobacily

Rod *Lactobacillus* je charakterizován jako gram-pozitivní, nesporulující, mikroaerofilní bakterie. Náleží do skupiny bakterií mléčného kvašení (Felis & Dellaglio 2007). Rod *Lactobacillus* vykazuje in vitro mikrobiální aktivitu (Beasley et al. 2006).

Manninen et al. (2006) ve své studii podávají psům přípravek obsahující směs laktobacilů. Dle následné analýzy rod *Lactobacillus* přežívá a dominuje v mikrobiotě tenkého střeva po dobu podávání a má schopnost modifikovat střevní mikroekosystém. *Lactobacillus fermentum* VET9A, *Lactobacillus plantarum* VET14A, *Lactobacillus rhamnosus* VET16A a jejich směs prokázaly dobrou adhezní schopnost ke střevnímu hlenu a byly schopny zabránit adhezi enteropatogenů (*Enterococcus canis*, *C. perfringens*, *Salmonella enterica ser. Typhimurium*) (Grzeškowiak et al. 2013; Grzeškowiak et al. 2014). Strompfová et al. (2006) zkoumají *L. fermentum* AD izolovaný z psích výkalů. Konstatují, že přežívá při pH 3.0 (přežilo 86,8 % po 3 hodinách) a v přítomnosti 1 % žluči (přežilo 75,4 %). Kmen ulpěl na střevním hlenu. Při délce podávání 7 dnů v dávce 10^9 KTJ/ml se ve výkalech výrazně zvýšily počty laktobacilů a enterokoků. Studie hodnotící schopnost *L. rhamnosus* GG přežít gastrointestinální tranzit u psů prokázala, že zotavení *L. rhamnosus* GG stále probíhá i po 4 dnech od ukončení podávání (Weese & Anderson 2002). Ve studii hodnotící kvalitu *L. acidophilus* DSM13241 jako krmného aditiva (10^9 KTJ/ml po dobu 4 týdnů zdravým dospělým psům) bylo zjištěno,

že mikroorganismus je stabilní v suchém krmivu. Přežil průchod trávicí soustavou a kolonizoval tlusté střevo. Ve výkalu zvýšil počet laktobacilů, snížil počty klostridií a celkově způsobil zlepšení krevních a imunitních parametrů (Baillon et al. 2004). Biagi et al. (2007) ve své studii dokládají snížení počtů *Clostridium difficile* po podávání *L. animalis* LA4 (10 dní v dávce $0,5 \times 10^9$ KTJ).

3.3.3.2.2 Bifidobakterie

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou charakterizovány jako nesporulující, anaerobní, tyčinkovité bakterie. Vyskytují se ve formě shluků či řetězců, nebo samostatně (Felis & Dellaglio 2007).

Trávicí soustava psa může být zdrojem bifidobakterií s probiotickým potenciálem (Grzeškowiak et al. 2015). Izoláty *B. animalis* spp. *lactis* přežily v simulovaném testu in vitro digesce, byly odolné vůči nízkému pH i žlučovým solím a prokazovaly silnou autoagregační aktivitu (Bunešová et al. 2012). Jia et al. (2010) uvádí výskyt bifidobakterií v počtu 10^8 buněk na gram psiho výkalu. O'Mahony et al. (2009) dokládají snížené počty *Clostridium difficile* po podávání *B. animalis* AHC7 po dobu šesti týdnů v dávce $1,5 \times 10^9$ KTJ.

3.3.3.2.3 Enterokoky

Obecně se mohou enterokoky vyskytovat ve formě izolovaných koků, v párech nebo v krátkých řetězcích. Jedná se o nesporulující, fakultativně anaerobní bakterie mléčného kvašení (Araújo & Ferreira, 2013). Zahrnují jak patogenní, tak komenzální mikroorganismy (Hanchi et al. 2018). Enterokoky jsou tolerantní k solím a kyselinám (Foulquié et al. 2006).

U několika rodů *Enterococcus* byla popsána produkce antimikrobiálních sloučenin včetně bakteriocinů, což je dnes považováno za probiotickou vlastnost (Yang et al. 2014). Zároveň jsou bakteriociny považovány za slibnou alternativu v boji proti antimikrobiální rezistenci (Hammami et al. 2013). Pokyny EFSA (EFSA, 2012) poskytují metodiku pro rozlišení mezi bezpečnými a potenciálně škodlivými kmeny *E. faecium* ve výživě zvířat. Podle těchto pokynů musí být rody *Enterococcus*, používané ve výživě zvířat, citlivé na ampicilin ($MIC \leq 2$ mg/l) a nesmí obsahovat jeden z genetických prvků IS16, hylEfm, a esp. Pro hodnocení nových probiotických kandidátů EFSA by měl být k dispozici celý kmenový genom (Brodmann et al. 2017).

3.3.4 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny jsou organické látky, nerozpustné ve vodě při $pH < 2$, vznikající rozkladem rostlinného materiálu (Svoboda 1983), neboli humifikací. Humifikace je druhý největší organický proces probíhající na Zemi hned po fotosyntéze. Díky tomuto procesu vzniká uhlí, ropa a další důležité látky (Swidsinski et al. 2017).

Huminové kyseliny mají nedefinované složení lišící se dle původu, procesu získávání a přítomnosti funkčních skupin v jejich strukturách jako jsou chinony, fenoly a karboxylové sloučeniny. Chinony jsou zodpovědné za tvorbu reaktivních forem kyslíku, které napomáhají hojení a mají fungicidní/baktericidní vlastnosti. Fenoly a karboxylové kyseliny se deprotonují v neutrálním a alkalickém prostředí a jsou důležité pro antioxidační a protizánětlivé vlastnosti organismu. Zejména přítomnost fenolických skupin poskytuje antioxidační vlastnosti díky

jejich schopnosti zachycovat volné radikály (De Melo et al. 2016). Za jeden z nejbohatších zdrojů huminových kyselin je považován leonardit (Tan 2014).

Vašková et al. (2011) se zaměřují na působení huminových kyselin z přírodních zdrojů v *in vitro* podmínkách na sledované parametry: antioxidační vlastnosti, enzymatický a neenzymatický antioxidační obranný systém v mitochondriích jater a vliv na kultivované rakovinné buněčné linie. V závěru studie shledává huminové kyseliny slibným prostředkem pro zvýšení imunity. Tikhonov et al. (2010) sledují schopnost růstu určitých kmenů bakterií izolovaných z trávicího traktu žížal a z půdy při použití huminové kyseliny z hnědého uhlí jako jediného zdroje uhlíku. Specifická rychlost růstu byla vyšší u bakterií izolovaných ze střev žížal. Nejaktivnější růst byl pozorován u kmenů *Paenibacillus sp.*, *Pseudomonas putida*, *Delftia acidovorans*, *Microbacterium terregens*, a *Aeromonas sp.* Swidsinski et al. (2017) ve své studii uvádí nárůst počtu bakterií střevní mikrobioty u zdravých dobrovolníků o 10 % po podávání huminových kyselin (přípravku Activomin) po dobu 35 dní.

Literatura uvádí, že používání huminových kyselin v chovech zvířat má vliv především na schopnost růstu a rozvoj imunity (Schuhmacher & Gropp 2000). Kucukersan et al. (2005) pozorují zvýšenou produkční účinnost krmiva a zvýšenou snášku vajec po zařazení huminových kyselin do krmné dávky nosnic. Tomuto zjištění odpovídá studie Avci et al. (2007) na křepelkách, ve které podávání huminových kyselin kuřatům po dobu pěti týdnů statisticky významně ovlivnilo hmotnost a konverzi krmiva. Naopak Rath et al. (2006) pozorují zpomalení růstu brojlerových kuřat po podávání huminových kyselin. Tato skutečnost však nebyla doprovázena žádnými škodlivými účinky na zdraví kuřat. Studie Galip et al. (2007) se zaměřuje na vliv huminových kyselin na fermentaci v bachoru beranů, potažmo na množství a typ protozoálního zastoupení. Zároveň byl vyhodnocen vliv huminových kyselin na krevní parametry. Délka trvání pokusu byla 22 dní a nebyl prokázán žádný významný rozdíl v biochemických a hematologických parametrech, proměnných bachorové tekutiny ani v druhovém protozoálním zastoupení. Islam et al. (2005) poukazují na velmi omezené množství vědeckých publikací zaměřujících se na efekt huminových kyselin u různých druhů zvířat.

4 Materiál a metody

4.1 Dotazník

V rámci podávání dietárního přídatku byl majiteli vyplněn dotazník hodnotící ochotu přijímat dietární přídatek, reakci na jeho podávání, konzistenci výkalu, příjem vody a celkový stav jedince během podávání dietárního přídatku (viz Příloha 1). Díky dotazníkům byly také získány podrobné informace o jednotlivých psech. Získaná data z oblasti vlivu podávání dietárního přídatku na vzhled výkalu a příjem vody byla vyhodnocena χ -kvadrát testem.

4.1.1 Informace o psech

Do pokusu bylo zapojeno celkem 21 psů pěti různých plemen a kříženců, obou pohlaví (15♀ + 5♂), medián věku byl 4 roky. Souhrnné informace o psech jako je jméno, pohlaví, plemenná příslušnost, hmotnost, způsob chovu, potrava, užívané doplňky stravy či kastrace zobrazuje Příloha 2.

Z dotazníků vyplývá, že 7 jedinců žije venku, zatímco zbylých 13 doma s majiteli. Nejčastější stravou jsou granule samotné a s příměsí konzervy. Dva jedinci (vz. 17 a vz. 18) jsou krmeni způsobem BARF. Krmná aditiva užívá 6 jedinců (vz. 8, vz. 14, vz. 15, vz. 16, vz. 17, vz. 18), z toho 3 jedinci užívají probiotika (vz. 12, vz. 17, vz. 18). Čtyři jedinci z našeho souboru byli kastrováni (vz. 6, vz. 16, vz. 18, vz. 21).

4.2 Stanovení počtů bakterií

V experimentu byly kultivačně stanoveny celkové počty anaerobních bakterií, počty bifidobakterií, laktobacilů, *Escherichia coli* a enterokoků celkem dvaceti psů. Psům byl jejich páníčky podáván po dobu čtrnácti dnů dietární přídatek ve formě tablet dle určeného dávkování. První odběr a následná kultivace byly provedeny před samotným zahájením podávání. Druhý odběr a kultivace následovaly po čtrnácti dnech užívání přípravku, tj 15. den. U čtyř náhodně vybraných jedinců byl realizován i 3. odběr, a to různě dlouhou dobu od ukončení podávání (7 dní, 14 dní, 2x 21 dní).

4.3 Podávaný dietární přídatek

Dle deklarovaného složení obsahoval přídatek leonardit, pivovarské kvasnice, řasu *Chlorella*, inaktivované kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* a mikroorganismus *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 v množství 2×10^{10} KTJ/kg. Obsah bakterií ve výrobku byl kultivačně ověřen.

4.4 Odběr vzorku

Dohromady bylo odebráno 46 fekálních vzorků. U jednoho psa (vz. 11) nebyl dodržen postup odběru vzorku dle dodané metodiky (Příloha 3), a tudíž nebyl do vyhodnocení zahrnut.

Každý majitel byl vybaven sadami na odebrání exkrementu a zároveň byl poučen o důležitosti přesného dodržení postupu. Sada obsahovala plastové lžičky, chladicí sáček

a zkumavky. Každá zkumavka byla předem zvážena a popsána. V každé zkumavce bylo 7,2 ml média ředící řady, 1,8 ml glycerinu a skleněné perly.

Odběr vzorku výkalu byl proveden bezprostředně po vykonání potřeby psa. Pomocí plastové lžičky byl odebrán přibližně 1 g vzorku a ten byl následně převeden do skleněné zkumavky. Při odběru musela být věnována zvýšená pozornost udržení otevřené zkumavky v kolmé poloze, aby nebylo narušeno její anaerobní prostředí únikem CO₂ či ztrátou živného média. Zkumavka s již odebraným vzorkem byla uschována v lednici s chladícím sáčkem a dopravena do laboratoře nejdéle do 24 hodin od odběru.

4.5 Kultivace

Pro stanovení celkového počtu anaerobních organismů, bifidobakterií, laktobacilů, *Escherichia coli* a enterokoků v exkrementech psů bylo připraveno celkem 6 různých kultivačních médií. Jejich specifika a jednotlivé podmínky kultivace jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Specifika kultivace jednotlivých skupin organismů

Skupiny mikroorganismů	Složení selektivního média na 100 ml dH ₂ O	Podmínky kultivace
Celkové počty anaerobních organismů	4,3 g Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (OXOID, UK) 0,5 g sójový pepton (OXOID, UK) 0,05 g cystein (OXOID, UK) 0,1 ml Tween (Sigma, US)	Anaerobně, 48 hodin, 37 °C
<i>Bifidobacterium</i> MUP	4,3 g Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (OXOID, UK) 0,5 g sójový pepton (OXOID, UK) 0,05 cystein (OXOID, UK) 0,1 ml Tween (Sigma, US) 100 µl ledové kyseliny octové 10 ml mupirocin (OXOID, UK)	Anaerobně, 48 hodin, 37 °C
<i>Bifidobacterium</i> NORF	4,3 g Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (OXOID, UK) 0,5 g sójový pepton (OXOID, UK) 0,05 cystein (OXOID, UK) 0,1 ml Tween (Sigma, US) 10 ml norfloxacin (OXOID, UK) 10 ml mupirocin (OXOID, UK)	Anaerobně, 48 hodin, 37 °C
<i>Lactobacillus</i>	6 g Rogosa agar (OXOID, UK) 132 µg kyseliny octové	Mikroaerofilně, 48 hodin, 37 °C
<i>Escherichia coli</i>	3,66 g TBX medium (OXOID, UK)	Aerobně, 24 hodin, 37 °C
<i>Enterococcus</i>	4,2 g Slanetz & Bartley medium (OXOID, UK)	Aerobně, 48 hodin, 37 °C

Pro kultivační stanovení byla vytvořena desítková ředící řada. Zkumavka se vzorkem výkalu byla považována za 1. ředění. Rozdíl mezi jednotlivými hmotnostmi zkumavek bez a se vzorkem byl vydělen číslem 1 a tím bylo zjištěno přesné množství vzorku potřebné k vytvoření 2. ředění. Zjištěné množství homogenizovaného vzorku bylo převedeno do penicilínky s médiem ředící řady (2. ředění) a dále rozředěno až do konečného ředění 10^8 . Příslušná ředění, ve kterých byl předpokládán detekovatelný a počítatelný nárůst kolonií (viz Tabulka 3), byla naočkována na Petriho misky.

Tabulka 3: Použitá ředění

Skupiny organismů	Ředění
Celkové počty koliformních bakterií	5. – 8.
Bifidobakterie	2. – 6.
Laktobacily	2. – 6.
<i>Escherichia coli</i>	2. – 6.
Enterokoky	2. – 6.

Postup kultivace byl totožný u všech vzorků. Narostlé kolonie byly spočítány a dle přepočtu vyjádřeny v jednotce log KTJ/g. Získané hodnoty jednotlivých skupin bakterií v 1. a 2. odběru byly následně porovnány a statisticky vyhodnoceny dvouvýběrovým párovým t-testem. Hodnoty získané třetím odběrem jsou spíše doplňujícího charakteru, neboť se nejedná o hodnoty celého původního souboru a vzorky jednotlivých psů byly odebrány různě dlouhou dobu od ukončení podávání.

4.6 Statistické vyhodnocení

Data jsou získána dvěma opakovanými měřeními u jednoho výběrového souboru. 1. měření proběhlo před aplikací pokusného zásahu, 2. po aplikaci pokusného zásahu. Takto získané hodnoty tvoří páry a při testování reprezentují jak kontrolní, tak i pokusnou skupinu porovnávaných dat.

- Nulovou hypotézou (H_0) je tvrzení, že střední hodnota měření před pokusem se neliší od střední hodnoty měření po pokusu, tzn. dietární přídavek nemá vliv na mikrobiologické parametry trávicího traktu psů. Nulová hypotéza byla přijata, pokud $p > \alpha$.
- Alternativní hypotézou (H_A) je tvrzení, že střední hodnota měření před pokusem se liší od střední hodnoty měření po pokusu, tzn. dietární přídavek má vliv na mikrobiologické parametry trávicího traktu psů. Alternativní hypotéza byla přijata, pokud $p \leq \alpha$.

Ke statistické analýze získaných souborů byl využit software STATISTICA 12.

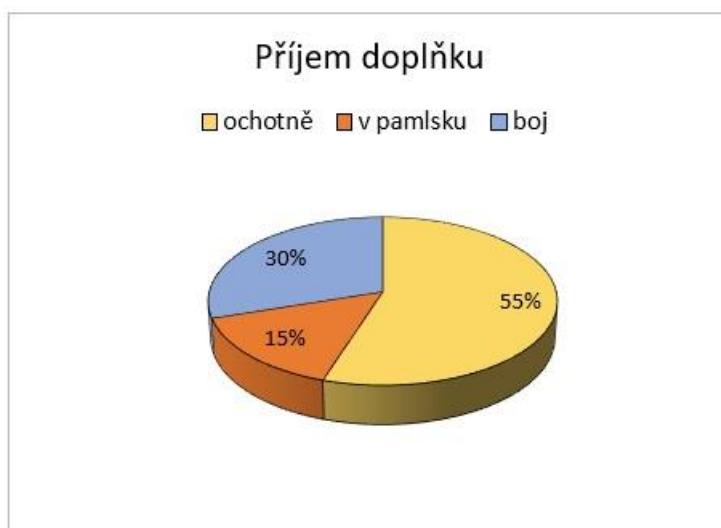
5 Výsledky

5.1 Dotazník

Cílem dotazníku bylo zjistit reakci psů na podávaný dietární přídatek. Dotazníky byly vyplněny majiteli doma. Vyhodnocení je nutno brát s rezervou, neboť silným faktorem je vyplňování různými lidmi. I přes dodanou metodiku se projevuje individuální posuzování každého majitele. Zároveň se nepodařilo získat kompletní data v některých úsecích dotazníku (příjem vody, konzistence výkalu).

5.1.1 Reakce na doplněk

Dotazník zohledňoval ochotu přijmout doplněk první den, druhý den, v průběhu testování a poslední den testování. Jednotliví psi vykazovali totožné preference v průběhu celého testování. Na doplněk reagovalo ochotně 11 psů (55 %), 3 psi (15 %) přijímali ochotně tablety zabudované v nějaké formě pamlsku. 6 psů (30 %) tablety odmítalo a pro majitele byl boj, aby pes tabletu přijal. Výsledky graficky znázorňuje Obrázek 3.



Obrázek 3: Ochota přijmout doplněk stravy ve formě tablet

5.1.2 Zvracení a vyhledávání trávy

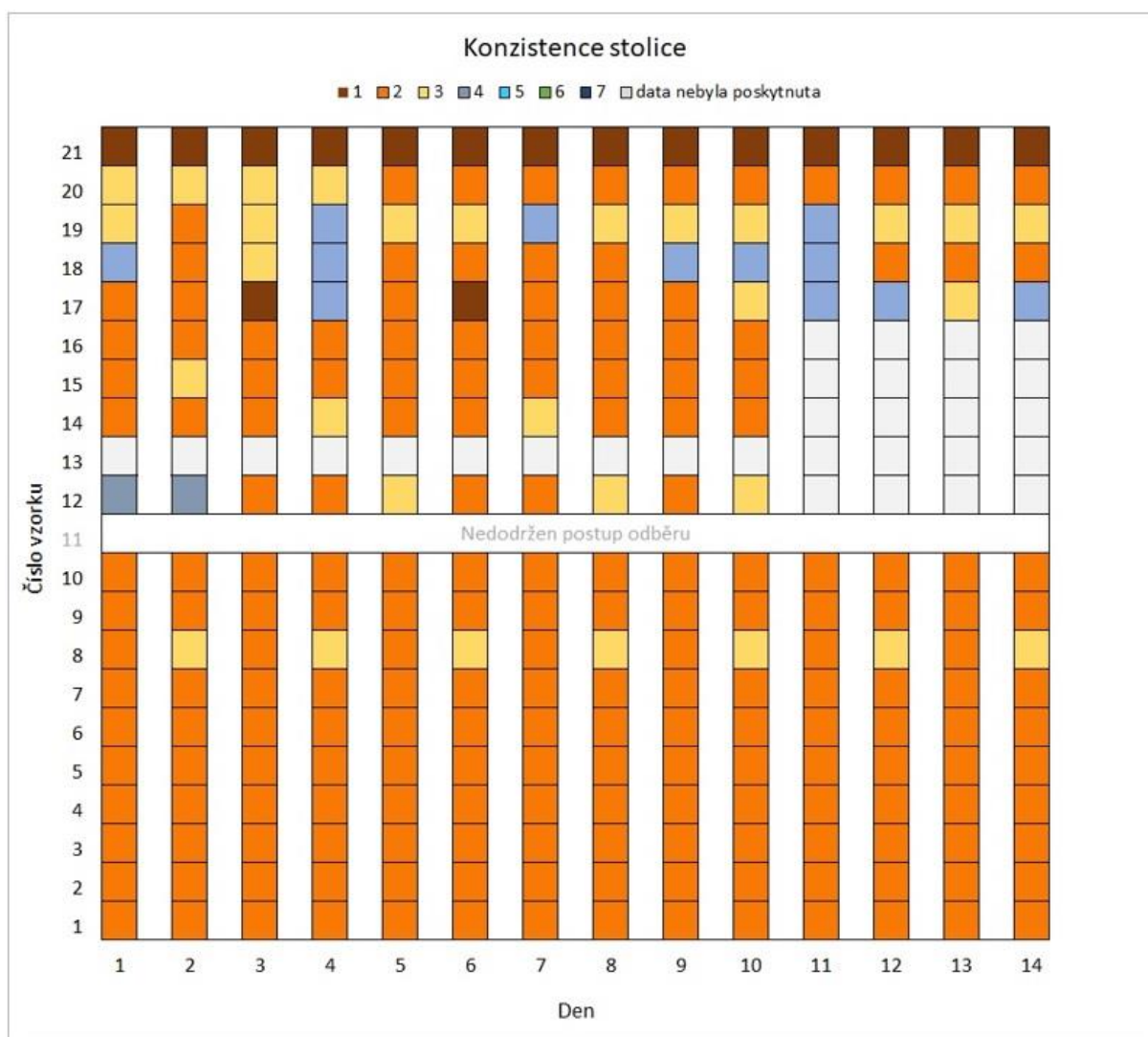
Dále bylo zjišťováno, zdali pes po dobu testování zvracel či vyhledával větší množství trávy. U jednoho psa (vz. 18) se v průběhu objevilo 1x zvracení. Větší množství trávy během testování nevyhledával ani jeden pes.

5.1.3 Konzistence výkalu

Majitelé sledovali a zaznamenávali každý den stav výkalu na stupnici 1–7 dle dodané metodiky (Příloha 1). U jednoho jedince (vz. 13) se nepodařilo získat výsledky, u čtyř jedinců jsou výsledky pouze částečné. Získané hodnoty jsou natolik konzistentní (viz Obrázek 4), že pomocí χ -kvadrát testu nebyla zjištěna žádná závislost mezi podáváním přídatku a konzistencí výkalu.

Z tohoto důvodu jsou výsledky zobrazeny vizualizací. Získané hodnoty se pohybovali v rozmezí stupnice 1–4.

Větší míru variability v konzistenci výkalů vykazovali čtyři jedinci (vz. 12, vz. 17, vz. 18, vz. 19). Vz. 12 vykazoval na počátku testování exkrement řidší, od 3. dne je znatelný posun k tužšímu výkalu. Nemáme však kompletní data a nelze tedy vyhodnotit vývoj od 10. do 14. dne. U vz. 17 a vz. 18 lze variabilitu v konzistenci výkalu vysvětlit typem krmiva. Pouze tito dva jedinci z našeho souboru jsou krmeni způsobem BARF. U vz. 19 se střídají dny s tužším i řidším typem výkalu bez zjištěné příčiny. U vz. 20 je od 5. dne patrný posun k tužšímu výkalu.



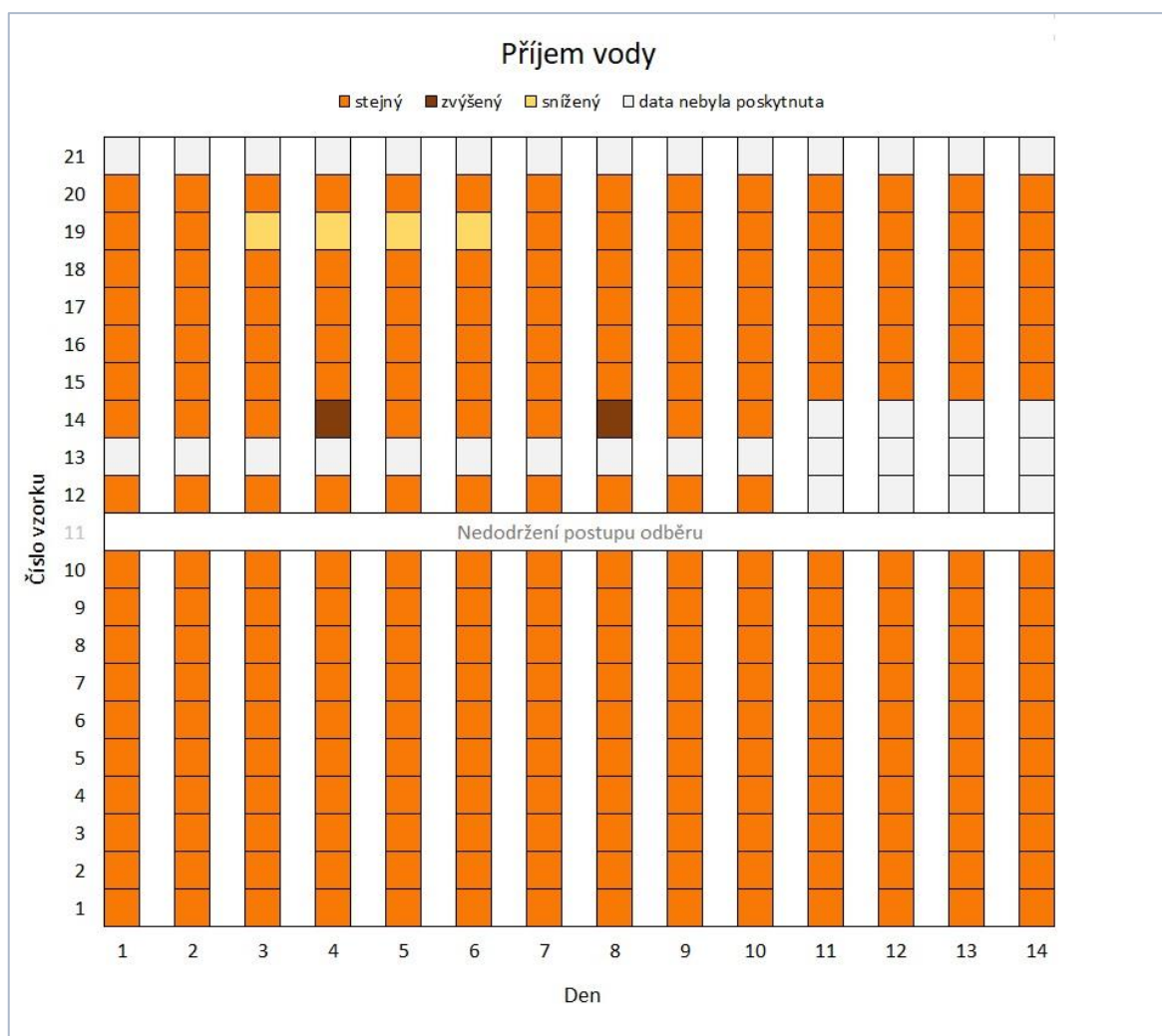
Obrázek 4: Grafické zobrazení konzistence výkalu dle jednotlivých dní u jednotlivých psů

5.1.4 Příjem vody

Majitelé sledovali a zaznamenávali množství přijímané vody každý den. Jednalo se buďto o množství zvýšené, snížené anebo stejné. U celkem 2 psů nebyla v této části dotazníku získána žádná data, u 2 psů se pak jedná o data částečná.

U psa (vz.14) se v průběhu testování objevil dva dny zvýšený příjem vody. U psa (vz.19) byla zaznamenána epizoda čtyř po sobě jdoucích dnů s nižším příjmem vody. Celkové získané

hodnoty jsou však natolik konzistentní (viz Obrázek 5), že pomocí χ -kvadrát testu nebyla zjištěna žádná závislost mezi podáváním přídatku a příjmem vody. Z tohoto důvodu jsou data zobrazena vizualizací.



Obrázek 5: Grafické zobrazení průběhu příjmu vody dle jednotlivých dní u jednotlivých psů

5.1.5 Celkový stav jedince

Majitelé sledovali změnu celkového stavu a celkového vzhledu jedince na konci celého testování. U jednoho psa (vz. 20) bylo patrné výrazné zhoršení. Pes měl sice více energie, zároveň byl ale netečný, agresivní a vyhledával samotu. Současně měl pes po podávání přípravku tužší exkrement, činilo mu ovšem větší potíže vyprázdnit se. U jednoho psa (vz. 18) pozorovala majitelka zlepšení celkového vzhledu. U zbylých devácti psů nepozorovali majitelé žádné změny. Výsledky získaných hodnot jsou graficky vyobrazeny na Obrázku 6.



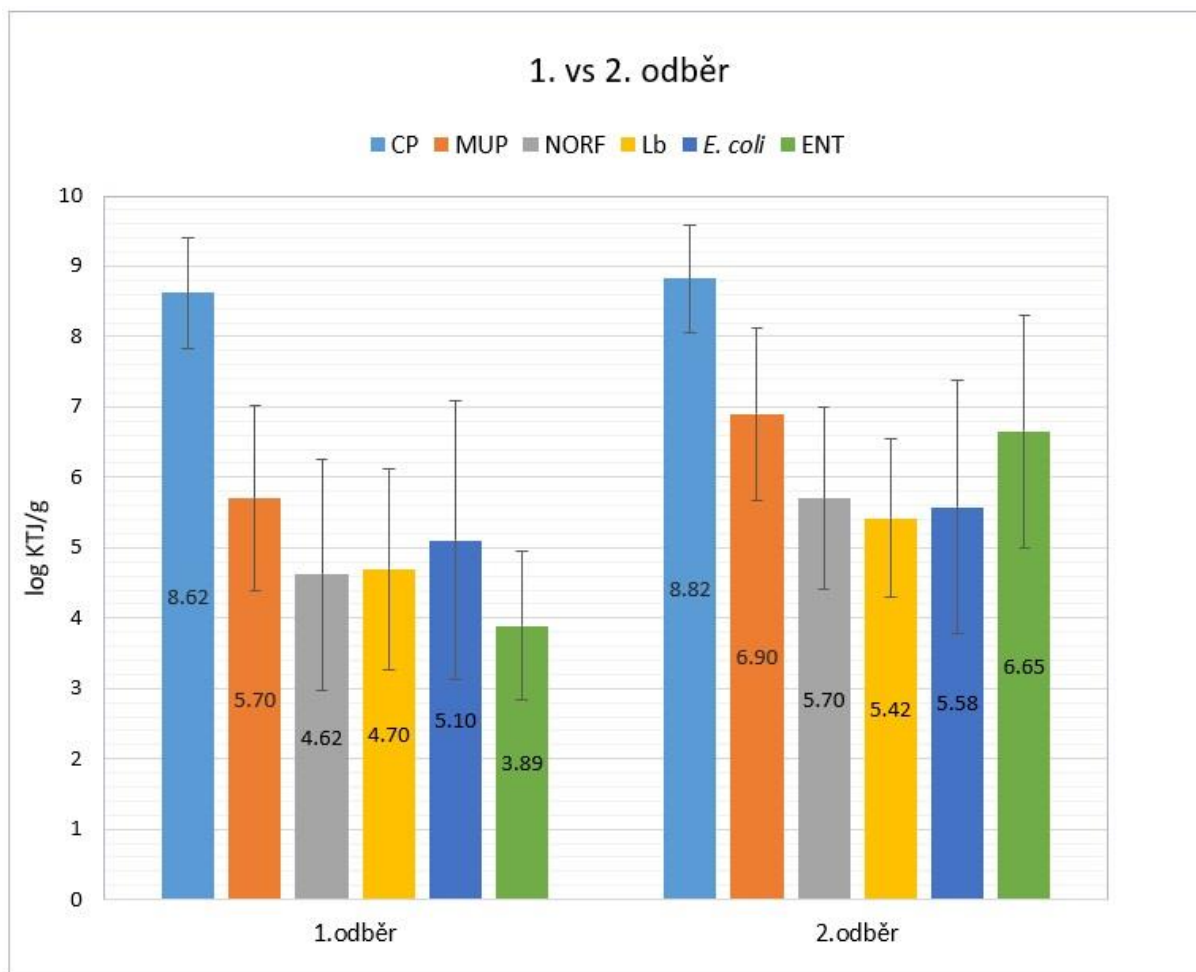
Obrázek 6: Celkový stav

5.2 Vyhodnocení kultivace

Cílem pokusu bylo ověřit počty jednotlivých skupin bakterií v psím výkalu před a po podávání dietárního přídatku s obsahem bakterie *Enterococcus faecium* NCIMB 10415. Tabulka 4 uvádí průměrné hodnoty \pm směrodatné odchylky celkem dvaceti psů zapojených do pokusu. Na Obrázku 7 jsou tyto hodnoty znázorněny graficky.

Tabulka 4: Počty narostlých kolonií 1. a 2. odběr (log KTJ/g)

Skupiny bakterií	1. odběr	2. odběr
Celkové počty koliformních bakterií	8,62 \pm 0,79	8,82 \pm 0,77
Bifidobakterie MUP	5,70 \pm 1,32	6,90 \pm 1,23
Bifidobakterie NORF	4,62 \pm 1,64	5,70 \pm 1,29
Laktobacily	4,70 \pm 1,43	5,42 \pm 1,13
<i>Escherichia coli</i>	5,10 \pm 1,98	5,58 \pm 1,79
Enterokoky	3,89 \pm 1,06	6,65 \pm 1,66



Obrázek 7: Počty kultivovaných bakteriálních skupin: 1. vs 2. odběr (log KTJ/g)

Označení CP značí celkové množství koliformních bakterií, MUP označuje bifidobakterie narostlé na kultivačním médiu s antibiotikem mupirocin, NORF značí bifidobakterie narostlé na kultivačním médiu s přidavkem antibiotika norfloxacin. Dále jsou v grafu vyobrazeny hodnoty laktobacilů (Lb), *E. coli* a enterokoků, jež jsou označeny zkratkou ENT. U všech bakteriálních skupin lze sledovat nárůst počtů v druhém odběru.

5.2.1 První odběr

V 1. odběru bylo průměrné množství celkového počtu koliformních bakterií $8,62 \pm 0,79$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnoty dosáhl vz. 9 s počtem 9,73 log KTJ/g. Hodnota bifidobakterií roustoucích na médiu s mupirocinem dosahovala $5,70 \pm 1,32$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnoty vykazuje opět vz. 9 a to 8,97 log KTJ/g. U 4 vzorků byly hodnoty nedetekovatelné (vz. 7, vz. 16, vz. 17, vz. 18). Bifidobakterie, rostoucí na médiu s norfloxacinem, dosahovaly hodnoty $4,62 \pm 1,64$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota 8,23 log KTJ/g náleží opět vz. 9. Nedetekovatelné hodnoty vykazovaly 4 vzorky (vz. 1, vz. 4, vz. 5, vz. 6). Laktobacily nabyly v 1. odběru průměrné hodnoty $4,70 \pm 1,43$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnotu vykazoval vz. 12 a to 7,37 log KTJ/g. Nedetekovatelné hodnoty byly zaznamenány u dvou vzorků (vz. 3, vz. 4). Průměrná hodnota *Escherichia coli* byla $5,10 \pm 1,98$. Nejvyšší hodnota 8,66 log KTJ/g byla zaznamenána u vz. 18. Nedetekovatelné hodnoty se objevily u třech vzorků (vz. 2, vz. 7, vz.

20). Průměrná hodnota bakteriální skupiny enterokoků dosáhla průměrné hodnoty $3,89 \pm 1,06$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnoty $5,98$ log KTJ/g dosáhl vz. 18. Nedetekovatelné množství bylo zjištěno u celkem deseti vzorků (vz. 1, vz. 2, vz. 3, vz. 4, vz. 5, vz. 6, vz. 9, vz. 10, vz. 14, vz. 16). Enterokoky byly přítomny u všech jedinců užívajících probiotika.

5.2.2 Druhý odběr

V 2. odběru bylo průměrné množství celkového počtu koliformních bakterií $8,82 \pm 0,77$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnoty dosáhl vz. 18 s počtem $9,66$ log KTJ/g. Průměrná hodnota bifidobakterií rostoucích na médiu s mupirocinem dosahovala hodnoty $6,90 \pm 1,23$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnotu vykazoval vz. 18 s hodnotou $8,59$ log KTJ/g. Bifidobakterie, rostoucí na médiu s norfloxacinem, dosahovaly hodnoty $5,70 \pm 1,29$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnotu $8,04$ log KTJ/g vykazuje vz. 9. Laktobacily nabyly v 2. odběru průměrné hodnoty $5,42 \pm 1,13$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnotu vykazoval vz. 9 a to $7,88$ log KTJ/g. Průměrná hodnota *Escherichia coli* byla $5,58 \pm 1,79$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota $9,04$ log KTJ/g byla zaznamenána u vz. 19. Průměrné počty enterokoků nabyly v 2. odběru hodnoty $6,65 \pm 1,66$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota $9,79$ log KTJ/g náležela vz. 8

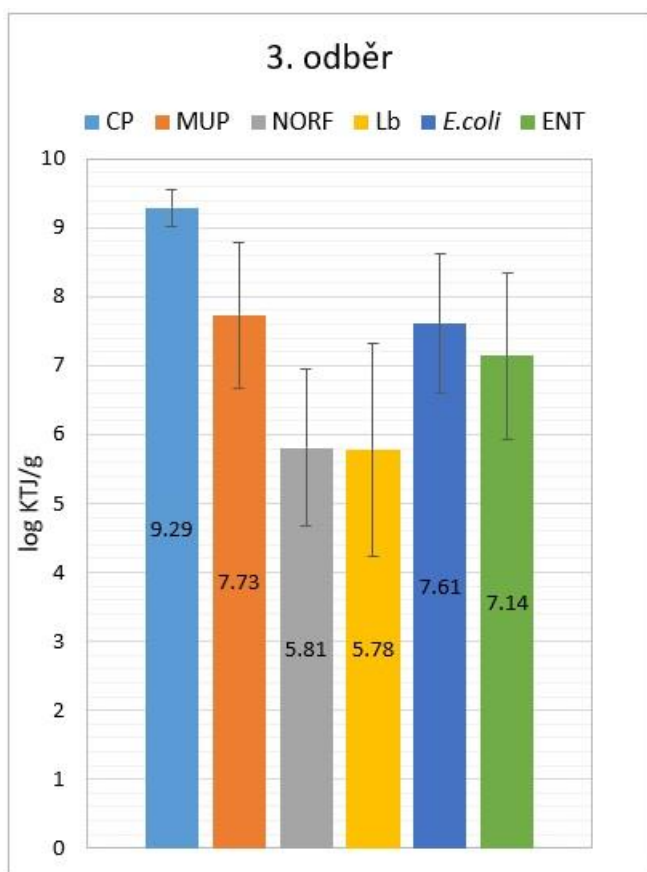
Ve 2. odběru byly detekovatelné počty kolonií ve všech bakteriálních skupinách u všech vzorků.

5.2.3 Třetí odběr

Doplňkový třetí odběr byl proveden u vz.13, vz. 17, vz. 18 a vz.19. Vz. 13 byl odebrán po sedmi dnech od ukončení podávání, vz. 17 a vz. 18 po dvacetjedna dnech od ukončení podávání, vz. 19 po čtrnácti dnech od ukončení podávání. Zjištěné průměrné hodnoty \pm směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tabulce 5. Obrázek 8 znázorňuje tyto hodnoty graficky.

Tabulka 5: Počty narostlých kolonií 3. odběr

Skupiny bakterií	3. odběr
Celkové počty koliformních bakterií	$9,29 \pm 0,27$
Bifidobakterie _{MUP}	$7,73 \pm 1,06$
Bifidobakterie _{NORF}	$5,81 \pm 1,13$
Laktobacily	$5,78 \pm 1,54$
<i>Escherichia coli</i>	$7,61 \pm 1,01$
Enterokoky	$7,14 \pm 1,21$



Obrázek 8: Počty kultivovaných bakteriálních skupin: 3. odběr (log KTJ/g)

Označení CP značí celkové množství koliformních bakterií, MUP označuje bifidobakterie narostlé na kultivačním médiu s antibiotikem mupirocin, NORF značí bifidobakterie narostlé na kultivačním médiu s přidavkem antibiotika norfloxacinu. Dále jsou v grafu vyobrazeny hodnoty laktobacilů (Lb), *E. coli* a enterokoků, jež jsou označeny zkratkou ENT.

Průměrná hodnota celkového počtu koliformních bakterií byla ve 3. odběru $9,29 \pm 0,27$ log KTJ/g. Nejvyššího množství dosáhl vz. 18 s hodnotou 9,58 log KTJ/g. Bifidobakterie rostoucí na médiu s mupirocinem vykazovaly průměrnou hodnotu $7,73 \pm 1,06$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota byla pozorována u vz. 19 (8,66 log KTJ/g). Bifidobakterie rostoucí na médiu s přidavkem norfloxacinu dosahovala průměrné hodnoty $5,81 \pm 1,13$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota 5,86 log KTJ/g byla pozorována u vz. 18. Laktobacily nabývaly průměrné hodnoty $5,78 \pm 1,54$ log KTJ/g. Vzorkem s nejvyšší hodnotou byl vz. 17 (8,04 log KTJ/g). Průměrná hodnota *Escheria coli* ve třetím odběru byla $7,61 \pm 1,01$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota 8,61 log KTJ/g náležela vz. 18. Průměrná hodnota skupiny enterokoků nabyla hodnotu $7,14 \pm 1,21$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána u vz. 17. a to 8,81 log KTJ/g.

Ve 3. odběru byly detekovatelné počty kolonií ve všech bakteriálních skupinách u všech vzorků.

5.3 Statistické vyhodnocení

Tabulka 6: Párový t-test 1. vs 2. odběr (hodnoty p)

Skupiny bakterií	p hodnota
Celkové počty koliformních bakterií	0,1486
Bifidobakterie _{MUP}	0,0048 *
Bifidobakterie _{NORF}	0,0010 *
Laktobacily	0,0512
Escherichia coli	0,3458
Enterokoky	1,2459E-08 *

* statisticky významný rozdíl na zvolené hladině pravděpodobnosti $\alpha \leq 0,05$

Na základě výsledků zobrazených v Tabulce 6 lze tvrdit, že přidavek huminových kyselin a probiotik měl vliv na některé mikrobiologické parametry trávicí soustavy psů. U bakteriálních skupin celkového počtů koliformních bakterií, laktobacilů a *E. coli* byla p hodnota větší než $\alpha = 0,05$. Na základě toho je pro skupinu celkových počtů koliformních bakterií, laktobacilů a *E. coli* přijímána H_0 , tedy že dietární přídavek nemá statisticky průkazný vliv na tyto mikrobiologické parametry trávicího traktu psů.

Oproti tomu u skupiny bifidobakterií rostoucích na obou médiích a skupiny enterokoků, se jedná o statisticky významný rozdíl, kdy p nabývá menší hodnoty než $\alpha = 0,05$. U skupiny enterokoků se jedná dokonce o statisticky vysoce významný rozdíl, kdy p nabývá hodnoty menší než $\alpha = 0,01$. Na základě tohoto výsledku je zamítnuta H_0 . Přijímáme tedy pro skupinu bifidobakterií a enterokoků H_A , že dietární přídavek s obsahem huminových kyselin a probiotik má vliv na tyto mikrobiologické parametry trávicího traktu psů.

Vzhledem k výše zjištěným výsledkům je dodatečně porovnána vzájemná závislost počtu bifidobakterií na počtu enterokoků. Vyhodnocení je provedeno regresní analýzou v programu STATISTICA 12, kdy závisle proměnnou jsou nejdříve počty bifidobakterií rostoucích na médiu s mupirocinem a následně pak bifidobakterie rostoucí na médiu s norfloxacinem. Nezávisle proměnnou představují v obou případech počty enterokoků. Regresní analýza neprokázala závislost ani v jednom z těchto případů.

6 Diskuze

V experimentální části bylo cílem stanovit vliv dietárního přídatku komerčního preparátu s obsahem huminových kyselin a probiotik na konzistenci exkrementů a jejich mikrobiologickou kvalitu.

Podávání probiotického přídatku s obsahem *E. faecium* NCIMB 10415 a huminových kyselin po dobu čtrnácti dnů vedlo ke statisticky významnému zvýšení celkového počtu bifidobakterií a enterokoků v psím výkalu u pozorovaného souboru. Nejvyšších hodnot enterokoků dosáhli jedinci, kterým byla probiotika podávána již před začátkem pokusu jejich majiteli.

Počty byly zjišťovány kultivační metodou. Z tohoto důvodu není možné určit přesný podíl *E. faecium* NCIMB 10415 z celkového počtu enterokoků. Lze ovšem předpokládat, že kmen *E. faecium* NCIMB 10415 byl schopen přežít průchod psím trávicím traktem, což vedlo k obohacení mikrobioty střeva. K podpoření tohoto tvrzení může sloužit studie Benyacoub et al. (2003), který podává *E. faecium* NCIMB 10415 štěňatům od odstavu do věku jednoho roku. Následně pomocí pulzní gelové elektroforézy dokládá přítomnost bakterií *E. faecium* NCIMB 10415 ve výkalech všech jedinců. U náhodně vybraných jedinců našeho pokusu bylo možné detekovat zvýšené počty enterokoků i 21 dní od ukončení podávání. Z klinického hlediska by perzistence během podávání měla být méně důležitá než kolonizace. Potencionální probiotický mikroorganismus by však měl být schopen kolonizovat trávicí trakt alespoň dočasně (Marciňáková et al. 2006).

Zvýšené počty bifidobakterií by mohly být ovlivněny zvýšenými počty enterokoků, jakožto bakterií mléčného kvašení produkujících kyselinu mléčnou a tím ovlivňující pH trávicího traktu. Regresní analýzou nebyla prokázána závislost vyšších počtů bifidobakterií na zvýšeném množství enterokoků. Jedním vysvětlením může být ovlivnění enterokoky i přesto, že tuto závislost regresní analýza nepotvrdila. Další možností může být spolupůsobení ostatních látek obsažených v dietárním přídatku. Působení a vzájemné interakce huminových kyselin, inaktivovaných kvasinek *Sacharomyces cerevisiae* a řasy *Chlorella* by mohl objasnit další a podrobnější výzkum.

Celkové počty koliformních bakterií, počty laktobacilů ani *E. coli* nebyly v průběhu studie statisticky významně ovlivněny.

K porovnání výsledků bylo využito studie Marciňáková et al. (2006). V této studii byl jedenácti zdravým psům podáván *E. faecium* EE3 v dávce 10^9 KTJ/ml po dobu sedmi dnů. Sledovány byly počty enterokoků, *E. faecium* EE3, počty bakterií mléčného kvašení, stafylokoky, *E. coli* a bakterie podobné *Pseudomonas* spp. Oproti naší studii byla k určení počtů a identifikaci bakteriálních skupin používána metoda PCR. Odběry byly prováděny 0. a 7. den, kontrolní odběr byl prováděn po třech měsících od ukončení podávání.

Podáváný *E. faecium* EE3 přetrvával ve výkalech psů až tři měsíce od ukončení podávání v průměrné koncentraci $6,82 \pm 0,85$ log KTJ/g. Tento výsledek potvrzuje úvahu o schopnosti *E. faecium* přežít průchod trávicím traktem a zároveň jej kolonizovat. Proti tomuto výsledku i našemu zjištění ohledně přežitelnosti se staví studie Garcia-Mazcorro et al. (2011) na zdravých psech. Poukazuje na zvýšení hojnosti *Enterococcus* spp. a *Streptococcus* spp. indukované podáváním synbiotika obsahujícího 7 probiotických kmenů (*Enterococcus faecium*, *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus*, *Bifidobacterium longum*,

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*). Tento nárůst byl ovšem pouze přechodný, a po ukončení podávání se počty vrátily na původní hodnoty.

Jednovýběrovým t-testem byly porovnány hodnoty enterokoků naší studie a studie Marciňáková et al. (2006). Pro porovnání byly zvoleny hodnoty 0. den vs 0. den a 7. den vs. 14. den pokusu. V obou případech byl mezi hodnotami statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Psi ve studii Marciňáková et al. (2006) vykazovali oproti našemu zjištění výrazně vyšší hodnoty enterokoků před samotným začátkem podávání. Vzhledem k tomu, že nejsou známy podrobné informace o těchto psech, nelze určit čím byla tato skutečnost způsobena. Oproti naší studii došlo v pokusu Marciňáková et al. (2006) 7. den podávání k poklesu počtu enterokoků oproti 0. dni. Marciňáková et al. (2006) vysvětluje tuto skutečnost konkurenčními interakcemi kmene EE3 a ostatních enterokoků. I přes zaznamenaný pokles byly celkové hodnoty enterokoků sedmý den statisticky významně vyšší než v naší studii po čtrnáctidenním podávání. Možné vysvětlení se nabízí ve zvoleném způsobu kvantifikace a identifikace, kdy PCR metoda nabízí mnohem přesnější výsledky než kultivační stanovení. Během podávání *E. faecium* EE3 pozorují Marciňáková et al. (2006) zvýšení počtu bakterií mléčného kvašení a významné snížení bakterií podobných *Pseudomonas* spp. a stafylokoků. Počty *E. coli* nebyly ovlivněny. Hodnoty *E. coli* studie Marciňáková et al. (2006) byly porovnány se zjištěnými hodnotami jednovýběrovým t-testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Porovnávány byly hodnoty 0. den vs 0. den a hodnoty 7. den vs 14. den. Ani v jednom případě nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi průměrem výběrového souboru a deklarovanou hodnotou.

Z vyhodnocení dotazníku vyplývá, že téměř polovina psů (45 %) měla problém s příjmem samotného dietárního přídatku ve formě tablet. Dle poznámek majitelů psů by pomohlo například dochucení samotného přídatku. Někteří by uvítali přídatek ve formě prášku nebo menších tabletek. Pozitivně lze hodnotit skutečnost, že se u žádného psa neprojevila trvalá negativní reakce ve formě zvracení či vyhledávání většího množství trávy. U jednoho psa (vz. 18) se objevilo v průběhu podávání jedenkrát zvracení. Nejednalo se o zvracení bezprostředně po požití přídatku a sama majitelka zmínila další skutečnosti, které tento jev mohly vyvolat.

Dietární přídatek neměl dle vyhodnocení dotazníku výrazný vliv na konzistenci výkalů ani na množství přijímané vody. Z dostupné škály (Příloha 1) hodnotící konzistenci výkalů na stupnici 1 až 7 (od nejtěžší po nejlehčí) dosahovali psi našeho souboru hodnot 1 až 4. Žádný z nich tedy neměl výrazné zažívací potíže v podobě průjmu. To by mohlo být důvodem vysoké konzistentnosti výsledků. Oproti tomu Bybee et al. (2011) podávají *E. faecium* NCIMB 10415 SF68 ($2,1 \times 10^9$ KTJ/g) pouze jedincům s výskytem průjmu a konstatují, že ani zde nemělo probiotikum žádný účinek na výskyt průjmu u psů, potažmo na konzistenci výkalů. Pinna a Biagi (2014) zmiňují jako slibný prostředek k upravení konzistence psích výkalů přídatek prebiotik.

Celkový stav většiny psů (90 %) zůstal stejný. U jednoho jedince (vz. 20) pozorovala majitelka zhoršení. Zhoršení stavu bylo pozorováno především v chování. Pes měl více energie, zároveň se ale stal netečným, nevyrovnaným a stranil se lidí. Pinna a Biagi (2014) zmiňují, že mikrobiální fermentace může pokrýt až 7 % energetických nároků dospělého psa. Vzhledem ke zvýšení počtů bakterií u tohoto jedince, lze zvýšenou aktivitu připisovat této skutečnosti.

K pochopení celkové změny chování by bylo potřeba komplexní vyšetření a kompletní mikrobiologický rozbor. Jak uvádí Pilla a Suchodolski (2020), manipulace s bakteriálními komunitami není snadná a mnohdy vede ke smíšeným výsledkům.

Hypotéza této práce nebyla potvrzena. Přídavek s obsahem huminových kyselin a probiotik nemá vliv na konzistenci výkalů, ale jen na mikrobiologické parametry trávicího traktu psů.

7 Závěr

- Podávání dietárního přídatku mělo vliv na mikrobiologické parametry trávicího traktu psů
- *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 je schopen přežít průchod trávicím traktem a kolonizovat jej
- Zvýšené počty bifidobakterií nebyly zcela objasněny a mohly by být předmětem dalšího zkoumání
- Podávání dietárního přídatku nemělo vliv na konzistenci výkalů
- Nejvyšší variabilitu konzistence výkalů vykazovali jedinci krmení způsobem BARF

8 Seznam literaury

- Araújo, T. F., Ferreira, C. L. de L. F. 2013. The genus enterococcus as probiotic: Safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **56**: 457–466.
- Avci, M., Denek, N., Kaplan, O. 2007. Effects of Humic Acid at different levels on growth performance, carcass yields and some biochemical parameters of quails. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **6**: 1–4.
- Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M. L., Maqbool, K., Webster, M. T., Perloski, M., Liberg, O., Arnemo, J. M., Hedhammar, Å., Lindblad-Toh, K. 2013. The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*. **495**: 360–364.
- Baillon, M. L. A., Marshall-Jones, Z. V., Butterwick, R. F. 2004. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs. *American Journal of Veterinary Research*. **65**: 338–343.
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., Williams, D. A. 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **32**: 9–25.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., Semenkovich, C. F., Gordon, J. I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**: 15718–15723.
- Beasley, S. S., Manninen, T. J. K., Saris, P. E. J. 2006. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*. **101**: 131–138.
- Bell, J. A., Kopper, J. J., Turnbull, J. A., Barbu, N. I., Murphy, A. J., Mansfield, L. S. 2008. Ecological Characterization of the Colonic Microbiota of Normal and Diarrheic Dogs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. **2008**: 1–17.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G. L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J., von der Weid, T. 2003. Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. *The Journal of Nutrition*. **133**: 1158–1162.
- Biagi, G., Cipollini, I., Pompei, A., Zaghini, G., Matteuzzi, D. 2007. Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Veterinary Microbiology*. **124**: 160–165.
- Bradshaw, J. W. S. 2006. The Evolutionary Basis for the Feeding Behavior of Domestic Dogs (*Canis familiaris*) and Cats (*Felis catus*). *The Journal of Nutrition*. **136**: 1927S–1931S.
- Brodmann, T., Endo, A., Gueimonde, M., Vinderola, G., Kneifel, W., de Vos, W. M., Salminen, S., Gómez-Gallego, C. 2017. Safety of novel microbes for human consumption: Practical examples of assessment in the European Union. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01725.

- Buddington, R. K. 2003. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. **64**: 646–651.
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Ročková, Š., Svobodová, I., Jebavý, L., Kmet', V. 2012. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains isolated from dog faeces. *Veterinary Microbiology*. **160**: 501–505.
- Bureš, J, Burešová, E, Rejchrt, S. 2002. Imunologické aspekty infekce *Helicobacter pylori*. *Acta Medica*. **45**: 3–10.
- Bybee, S. N., Scorza, A. V., Lappin, M. R. 2011. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **25**: 856–860.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., Knight, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell*. **148**: 1258–1270.
- Collado, M. C., Grześkowiak, Ł., Salminen, S. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Current Microbiology*. **55**: 260–265.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*. **45**: 454–460.
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., Knight, R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. **326**: 1694–1697.
- De Melo, B. A. G., Motta, F. L., Santana, M. H. A. 2016. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering: C*. **62**: 967–974.
- Delucchi, L., Fraga, M., Perelmuter, K., Cidade, E., Zunino, P. 2008. Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *Canadian Veterinary Journal*. **49**: 991–994.
- Dickson, R., Martinez, F., Huffnagle, G. 2014. The Role of the microbiome in Exacerbations of Chronic Lung Diseases. *The Lancet*. **384**: 691–702.
- EFSA (2012). Scientific Opinion on Lactiferm R (*Enterococcus faecium*) as a feed additive for weaned piglets and calves. *EFSA Journal*. **10**. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2574
- Evrard, E., Hoet, P.P., Eyssen, H., Charlier, H. & Sacquet, E. 1964. Faecal lipids in germ-free and conventional rats. *British Journal of Experimental Pathology*. **45**: 409–414.
- FAO/WHO. 2002. Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO/WHO. Lodon Ontario. Available from: www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (accessed December 2019).

- Felis, G. E., Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. **8**: 44–61.
- Fiocchi, A., et al. 2012. Clinical Use of Probiotics in Pediatric Allergy (CUPPA): A World Allergy Organization Position Paper. *World Allergy Organization Journal*. **5**: 148–167.
- Foolquié, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. **106**: 1–24.
- Galip, N., Polat, U., Biricik, H. 2009. Effects of supplemental humic acid on ruminal fermentation and blood variables in rams. *Italian Journal of Animal Science*. **9**: 390–393.
- Garcia-Mazcorro, J. F., Dowd, S. E., Poulsen, J., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. 2012. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. *MicrobiologyOpen*. **1**: 340–347.
- Garcia-Mazcorro, J. F., Lanerie, D. J., Dowd, S. E., Paddock, C. G., Grütznert, N., Steiner, J. M., Ivanek, R., Suchodolski, J. S. 2011. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*. **78**: 542–554.
- Geigerová, M., Vlková, E., Skřivanová, E., Bunešová, V. 2014. Odlišnosti v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců. *Veterinářství*. **7**: 522–526.
- German, A. J., Day, M. J., Ruaux, C. G., Steiner, J. M., Williams, D. A., Hall, E. J. 2003. Comparison of Direct and Indirect Tests for Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Antibiotic-Responsive Diarrhea in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **17**: 33–43.
- Gibson, G. R., et al. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin*. **7**: 1–19.
- Gras-Le Guen, C., Launay, E., Caillon, J. 2015. Microbiote intestinale et antibiothérapie périnatale. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 2015. **470**: 39–42.
- Grześkowiak, L., Collado, M. C., Beasley, S., Salminen, S. 2014. Pathogen exclusion properties of canine probiotics are influenced by the growth media and physical treatments simulating industrial processes. *Journal of Applied Microbiology*. **116**: 1308–1314.
- Grześkowiak, L., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S. 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*. **34**: 14–23.
- Grześkowiak, L., Endo, A., Collado, M. C., Pelliniemi, L. J., Beasley, S., Salminen, S. 2013. The effect of growth media and physical treatments on the adhesion properties of canine probiotics. *Journal of Applied Microbiology*. **115**: 539–545.

- Guard, B. C., et al. 2019. Longitudinal assessment of microbial dysbiosis, fecal unconjugated bile acid concentrations, and disease activity in dogs with steroid-responsive chronic inflammatory enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **33**: 1295–1305.
- Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C., Fliss, I. 2013. Anti-infective properties of bacteriocins: An update. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2013**: 2947–2967.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. 2018. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-An Update. *Frontiers in Microbiology*. **9**: 1791.
- Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology*. **76**: 301–310.
- Heaton, K. W., Lewis, S. J. 1997. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. **32**: 920–924.
- Igarashi, H., Maeda, S., Ohno, K., Horigome, A., Odamaki, T., Tsujimoto, H. 2014. Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs. *PLoS ONE*. **9** (e107909) DOI: 10.1371/journal.pone.0107909.
- Islam, K. M. S, Schuhmacher, A., Gropp, J. M. 2005. Humic Acid Substances in Animal Agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition*. **4**: 126–134.
- Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G. R., Rastall, R. A., McCartney, A. L. 2010. Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhea. *FEMS Microbiology Ecology*. **71**: 304–312.
- Jiménez, E., et al. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*. **51**: 270–274.
- Jergens, A. E., Crandell, J., Morrison, J. A., Deitz, K., Pressel, M., Ackermann, M., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., Evans, R. 2010. Comparison of oral prednisone and prednisone combined with metronidazole for induction therapy of canine inflammatory bowel disease: A randomized-controlled trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **24**: 269–277.
- Jones, S. E., Versalovic, J. 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*. **9**. DOI: 10.1186/1471-2180-9-35.
- Kucukersan, S., Kucukersan, K., Colpan, I., Goncuoglu, E., Reisli, Z., Yesilbag, D. 2005. The effects of humic acid on egg production and egg traits of laying hen. *Veterinarni Medicina*. **5**: 406–410.
- Kwong, J. C., McCallum, N., Sintchenko, V., Howden, B. P. 2015. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*. **47**: 199–210.

- Lata, J., Juránková, J. 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *Interni Medicina pro Praxi*. **13**: 63–69.
- Lee, W. J., Hase, K. 2014. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*. **10**: 416–424.
- Liévin-le Moal, V., Servin, A. L. 2006. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*. **19**: 315–337.
- Manninen, T. J. K., Rinkinen, M. L., Beasley, S. S., Saris, P. E. J. 2006. Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 6539–6543.
- Marciňáková, M., Simonová, M., Stropfová, V., Lauková, A. 2006. Oral application of *Enterococcus faecium* strain EE3 in healthy dogs. *Folia Microbiologica*. **51**: 239–242.
- Markowiak, P., Ślizewska, K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*. **10**. DOI: 10.1186/s13099-018-0250-0.
- Marks, S. L., Kather, E. J., Kass, P. H., Melli, A. C. 2002. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in Diarrheic and Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **16**: 533–540.
- Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M. E., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S. 2014. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*. **174**: 463–473.
- Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. 2009. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*. **19**: 636–43.
- O'Mahony, D., Murphy, K. B., MacSharry, J., Boileau, T., Sunvold, G., Reinhart, G., Kiely, B., Shanahan, F., O'Mahony, L. 2009. Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium*-From gut to gut. *Veterinary Microbiology*. **139**. 106–112.
- Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T., Cominelli, F. 2010. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**: 454–459.
- Pang, J. F. et al., 2009. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution*. **26**: 2849–2864.
- Pilla, R., Suchodolski, J. S. 2020. The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*. **6**: 1–12.
- Pinna, C., Biagi, G. 2014. The utilisation of prebiotics and synbiotics in dogs. *Italian Journal of Animal Science*. **13**: 169–178.

- Qin, J. et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. **464**: 59–65.
- Rada, V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní Medicína pro Praxi*. **12**: 92–97.
- Rath, N. C., Huff, W. E., Huff, G. R. 2006. Effects of humic acid on broiler chickens. *Poultry Science*. **85**: 410–414.
- Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., Isolauri, E. 2012. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. **9**: 565-576.
- Rossi, G., Pengo, G., Caldin, M., Piccionello, A. P., Steiner, J. M., Cohen, N. D., Jergens, A. E., Suchodolski, J. S. 2014. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* (9 e94699) DOI: 10.1371/journal.pone.0094699.
- Sarowska, J., Choroszy-Król, I., Regulska-Ilow, B., Frej-Mądrzak, M., Jama-Kmiecik, A. 2013. The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. **22**: 759-766.
- Schaible, U. E., Kaufmann, S. H. E. 2005. A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends in Microbiology*. **13**: 373-380.
- Schmitz, S., Suchodolski, J. 2016. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*. **2**: 71-94.
- Schuhmacher, A., Gropp, J. M. 2000. Effect of humic acids on health state and performance of weaners. *Proceeding of the Society of Nutrition Physiology*. **9**: 77.
- Simpson, K. W., Batt, R. M., Jones, D., Morton, D. B. 1990. Effects of exocrine pancreatic insufficiency and replacement therapy on the bacterial flora of the duodenum in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. **51**: 203–206.
- 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. *Microbial Ecology*. **44**: 186–197.
- Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., Gordon, J. I. 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 15451–15455.
- Strompfová, V., Marciňáková, M., Simonová, M., Bogovič-Matijašić, B., Lauková, A. 2006. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Anaerobe*. **12**: 75-79.

- Suchodolski, J. S. 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats; a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **41**: 261-272.
- Suchodolski, J. S., Camacho, J., Steiner, J. M. 2008. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. **66**: 567–578.
- Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Westermarck, E., Steiner, J. M., Wolcott, R. D., Spillmann, T., Harmoinen, J. A. 2009. 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 Microbiology*. **9**. 1–16.
- Suchodolski, J. S., et al. 2012. The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*. 7 (e51907). DOI: 10.1371/journal.pone.0051907.
- Svoboda, J. 1983. *Encyklopedický slovník geologických věd*. Academia. Praha.
- Swanson, K. S., et al. 2011. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME Journal*. **5**: 639–649.
- Swidsinski, A., Dörffel, Y., Loening-Baucke, V., Gille, C., Reißhauer, A., Göktas, O., Krüger, M., Neuhaus, J., Schrödl, W. 2017. Impact of humic acids on the colonic microbiome in healthy volunteers. *World Journal of Gastroenterology*. **23**: 885–890.
- Šterc, J., Štercová, E. 2014. Výživa a potřeba živin u psů. *Veterinářství*. **64**: 583–589.
- Tan, K. H. 2014. *Humic Matter in Soil and the Environment: Principles and Controversies*. CRC Press. Boca Raton.
- Tannock, G. W. 1995. *Normal microflora: An introduction to microbes inhabiting the human body*. Chapman & Hall. London.
- Thalmann, O. et al., 2013. Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic dog. *SCIENCE*. **342**: 871–874.
- Tikhonov, V. V., Yakushev, A. V., Zavgorodnyaya, Byzov, B. A., Demin, V. V. 2010. Effects of humic acids on the growth of bacteria. *Eurasian Soil Science*. **43**: 305–313.
- Unterer, S., Strohmeier, K., Kruse, B. D., Hartmann, K. 2011. Treatment of Aseptic Dogs with Hemorrhagic Gastroenteritis with Amoxicillin/Clavulanic Acid A Prospective Blinded Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **25**: 973–979.
- Vašková, J., Velická, B., Pilátová, M., Kron, I., Vaško, L. 2011. Effects of humic acids in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*. **47**: 376–382.
- Viswanathan, V. K., Hodges, K., Hecht, G. 2009. Enteric infection meets intestinal function: How bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nature Reviews Microbiology*. **7**: 110–119.

- Votava, Miroslav. 2001. Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun. Brno.
- Wang, X., Tedford, R. H. 2008. Dogs: Their fossil relatives and evolutionary history. Columbia University Press. New York.
- Weese, J. S., Anderson, M. E. C. 2002. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *Canadian Veterinary Journal*. **43**: 771–774.
- White, R., et al. 2017. Randomized, controlled trial evaluating the effect of multi-strain probiotic on the mucosal microbiota in canine idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. **8**: 451–466.
- Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., Van House, A. M., Suchodolski, J. S. 2008. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiology Ecology*. **66**: 579–589.
- Xu, J., Gordon, J. I. 2003. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**: 10452–10459.
- Yamada E., T. Ozaki, M. Kimura. 1998. Determination and behavior of humic substances as precursors of trihalomethane in environmental water. *Analytical Sciences*. **14**: 327–332.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., Fang, J. Y. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*. **5**: 241.
- Zicha, O. 2007. Profil taxonu *Canis lupus f. familiaris*. Biolib. Available from www.biolib.cz/cz/taxon/id1855/#orig (accessed December 2019).
- Zhang, Y. J., Li S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., Li, H. B. 2015. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. **16**: 7493–519.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

BARF – Bones and Raw food; syrová strava a kosti

EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin

FAO – Organizace pro výživu a zemědělství

IBD – Chronické zánětlivé onemocnění střev

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

WHO – Světová zdravotnická organizace

10 Samostatné přílohy

Příloha 1: Dotazník a metodika hodnocení konzistence výkalu

Testování doplňku na trávení

Vážení respondenti,

Velmi Vám děkujeme za ochotu zapojit se do testování nově vznikajícího doplňku pro Vašeho čtyřnohého přítele. Testování by mělo probíhat 14 dnů.

Charakteristika: Doplňek je určen pro psy všech věkových kategorií a je možné jej použít pro detoxikaci organismu, podporu a stabilizaci žádoucí střevní mikroflóry aj. Přípravek obsahuje pivovarské kvasnice, leonardit, chlorellu a další účinné látky, které mají příznivý dopad na trávicí trakt.

Krmný návod a doporučené dávkování: doplňek by měl být podáván pravidelně nejlépe 2 x denně (množství tablet rozdělit do dvou porcí, tzn. pes vážící 10 kg, by měl dostat 2 tablety ráno a 2 tablety večer).

Hmotnost psa	Množství tablet/ den
Do 5 kg	1 ($\frac{1}{2} + \frac{1}{2}$)
Do 10 kg	2 (1 + 1)
Do 20 kg	4 (2 + 2)
Do 50 kg	6 (3 + 3)
Nad 50 kg	8 (4 + 4)
80 kg a více	10 (5 + 5)

Zajímá nás vzhled exkrementů, pitný režim psa, případné změny v aktivitě psa aj.

Proto bychom Vás touto cestou rádi požádali o přesné a zodpovědné vyplnění přiloženého formuláře, který následně bude využit při hodnocení spokojenosti s novým typem doplňku, jeho složením, aj.

Několik poznámek k průběhu a hodnocení testu:

Z důvodu maximální objektivity prosím poznamenejte mimo dotazované veškeré informace, o kterých byste si mysleli, že jsou důležité.

Doplňek je možné přimíchávat k jakémukoli typu krmiva (granule, BARF, vařené, konzervy aj.) a je potřebné dodržovat dávkování uvedené v manuálu.

Psa krmte tak, jak jste zvyklí.

Pokud byste u psa pozorovali jakékoli odchylky od normálního stavu/ museli jste z jakéhokoli důvodu testaci přerušit, dávkování doplňku zastavte a krmte dle potřeb situace. Do dotazníku napište poté termín a důvod předčasného ukončení testu.

Je nám jasné, že toto období pro Vás možná bude znamenat více práce s Vaším mazlíčkem, než jste obvykle zvyklí, ale možná Vám to přinese i spoustu užitečných informací o Vašem čtyřnohém příteli.

Za spolupráci Vám předem děkujeme a těšíme se na výsledky.

Chutnost krmiv pro psy – dotazník

Test provedl (jméno):

Doplněk byl podáván v období od:

do:

DOTAZY TÝKAJÍCÍ SE PSA:

Plemeno psa:

Pohlaví psa:

Kastrace:

Ano

Ne

Věk psa:

Podmínky chovu (doma, kotec, aj.):

Aktivita:

Typ krmení podávaného v průběhu testu:

Dostává/dostával (kdy) pes nějaký jiný doplněk krmiva?

Pokud ANO, jaký

1) Reakce na doplněk 1. den:

- a. Pes tablety přijímal ochotně (samotné tablety)
- b. Pes tablety přijímal zapracované v nějaké „mňamce“ (sýr, salám aj.)
- c. Pes tablety nechtěl přijmout = byl to boj
- d. Jiné (doplňte):

2) Reakce na doplněk 2. den:

- a. Pes tablety přijímal ochotně (samotné tablety)
- b. Pes tablety přijímal zapracované v nějaké „mňamce“ (sýr, salám aj.)
- c. Pes tablety nechtěl přijmout = byl to boj
- d. Jiné (doplňte):

3) Reakce na doplněk v průběhu testace:

- a. Pes tablety přijímal ochotně (samotné tablety)
- b. Pes tablety přijímal zapracované v nějaké „mňamce“ (sýr, salám aj.)
- c. Pes tablety nechtěl přijmout = byl to boj
- d. Jiné (doplňte):

4) Reakce na doplněk poslední den testace:

- a. Pes tablety přijímal ochotně (samotné tablety)
- b. Pes tablety přijímal zapracované v nějaké „mňamce“ (sýr, salám aj.)
- c. Pes tablety nechtěl přijmout = byl to boj
- d. Jiné (doplňte):

5) Pes zvracel během podávání testovaného doplňku:

Ano

Ne

Poznámky:

6) Pes vyhledával/ pojídal po dobu krmení větší množství trávy:

Ano Ne

Poznámky:

7) Konzistence výkalu v průběhu krmení testovaným krmivem:

(hodnocení výkalu dle dokumentu „hodnocení vzhledu exkrementu“)

1. den	1	2	3	4	5	6	7
2. den	1	2	3	4	5	6	7
3. den	1	2	3	4	5	6	7
4. den	1	2	3	4	5	6	7
5. den	1	2	3	4	5	6	7
6. den	1	2	3	4	5	6	7
7. den	1	2	3	4	5	6	7
8. den	1	2	3	4	5	6	7
9. den	1	2	3	4	5	6	7
10. den	1	2	3	4	5	6	7
11. den	1	2	3	4	5	6	7
12. den	1	2	3	4	5	6	7
13. den	1	2	3	4	5	6	7
14. den	1	2	3	4	5	6	7

Poznámky:

8) Jaký byl příjem vody po dobu testování? *(porovnejte oproti normálu – kolik vody doplňujete do*

misky/den)

1. den	stejný	zvýšený	snížený
2. den	stejný	zvýšený	snížený
3. den	stejný	zvýšený	snížený
4. den	stejný	zvýšený	snížený
5. den	stejný	zvýšený	snížený
6. den	stejný	zvýšený	snížený
7. den	stejný	zvýšený	snížený
8. den	stejný	zvýšený	snížený
9. den	stejný	zvýšený	snížený
10. den	stejný	zvýšený	snížený
11. den	stejný	zvýšený	snížený
12. den	stejný	zvýšený	snížený
13. den	stejný	zvýšený	snížený
14. den	stejný	zvýšený	snížený








Poznámky:

9) Celkový stav a vzhled zvířete po krmení testovaným krmivem:

- Zůstala stejná.
- Zlepšila se.
- Zhoršila se.

Škála konzistence výkalu

(dle Heaton, K. W. & Lewis, S. J. 1997)

Označení	Ilustrační fotografie	Popis
I.		<ul style="list-style-type: none"> • Velmi tuhé a suché • Vylučovány jednotlivé „peletky“ • Vyloučení vyžaduje hodně úsilí • Po sebrání nezanechá žádné stopy na zemi
II.		<ul style="list-style-type: none"> • Pevné, ale ne tvrdé • Po sebrání nezanechá žádné nebo velmi malé stopy na zemi
III.		<ul style="list-style-type: none"> • Malá nebo žádná segmentace • Po sebrání zanechá na zemi zbytek, nicméně drží tvar
IV.		<ul style="list-style-type: none"> • Vlhký povrch • Po sebrání zanechá na zemi zbytek, nadržuje tvar
V.		<ul style="list-style-type: none"> • Velmi vlhký povrch • Tvoří hromádku • Po sebrání zanechá na zemi zbytek, nadržuje tvar
VI.		<ul style="list-style-type: none"> • Viditelná textura • Velmi řídké
VII.		<ul style="list-style-type: none"> • Vodnaté • Žádná textura

Příloha 2: Podrobné informace o psech získané z dotazníků

Číslo vzorku	Jméno	Pohlaví	Plemenná příslušnost	Hmotnost	Věk (roky)	Způsob chovu	Strava	Doplňky stravy	Kastrace
Vz. 1	Zairin	♀	Border kolie	do 20 kg	7	kotec	granule	-	
Vz. 2	Baileys	♀	Border kolie	do 20 kg	6	kotec	granule	-	
Vz. 3	Findza	♀	Border kolie	do 20 kg	5	kotec	granule	-	
Vz. 4	Darcy	♀	Border kolie	do 20 kg	7	doma	granule	-	
Vz. 5	Grace	♀	Border kolie	do 20 kg	3	kotec	granule	-	
Vz. 6	Rose	♀	Border kolie	do 20 kg	4	doma	granule	-	X
Vz. 7	Storm	♀	Border kolie	do 20 kg	2	kotec	granule	-	
Vz. 8	Bentley	♂	Kavalír King Charles Spaniel	do 10 kg	5	doma	granule	probiotika	
Vz. 9	Kiss	♀	Border kolie	do 20 kg	4	kotec	granule	-	
Vz. 10	Fixxa	♀	Border kolie	do 20 kg	3	kotec	granule	-	
Vz. 11	Nedodržení postupu odběru								
Vz. 12	Mia	♀	Border kolie	do 20 kg	7	doma	granule	-	
Vz. 13	Loki	♂	Americký stafordširský teriér	do 50 kg	1	doma	granule	-	
Vz. 14	Sofie	♀	bez PP	do 5 kg	2	doma	granule + konzerva	lososový olej, kelpa	
Vz. 15	Lucky	♂	bez PP	do 5 kg	2	doma	granule + konzerva	lososový olej, kelpa	
Vz. 16	Jackie	♀	bez PP	do 5 kg	4	doma	granule + konzerva	lososový olej, kelpa	X
Vz. 17	Bašar	♂	Vipet	do 20 kg	4	doma	BARF	probiotika, Geloren, Pangamin, kelpa, oleje, semínka	
Vz. 18	Zojja	♀	Basenji	do 10 kg	5	doma	BARF	probiotika, Geloren, Pangamin, kelpa, oleje, semínka	X
Vz. 19	Kaya	♀	bez PP	do 20 kg	4	doma	granule + konzerva + pečivo	-	
Vz. 20	Fido	♂	bez PP	do 50 kg	8	doma	granule + konzerva	-	
Vz. 21	Ája	♀	Border kolie	do 20 kg	8	doma i venku	konzerva	-	X

Metodika odběru vzorku

Vážení respondenti,

v rámci testování nového doplňku stravy pro psy je prováděn mikrobiologický rozbor výkalu. Sledovány budou celkové počty koliformních bakterií, laktobacilů, bifidobakterií, *Escherichia coli* a enterokoků.

Celkem budou provedeny 2 odběry!

1. odběr proved'te ještě před začátkem podávání doplňku stravy
2. odběr proved'te na konci testování, tj. 15. den

Způsob odběru je shodný pro 1. i 2. odběr

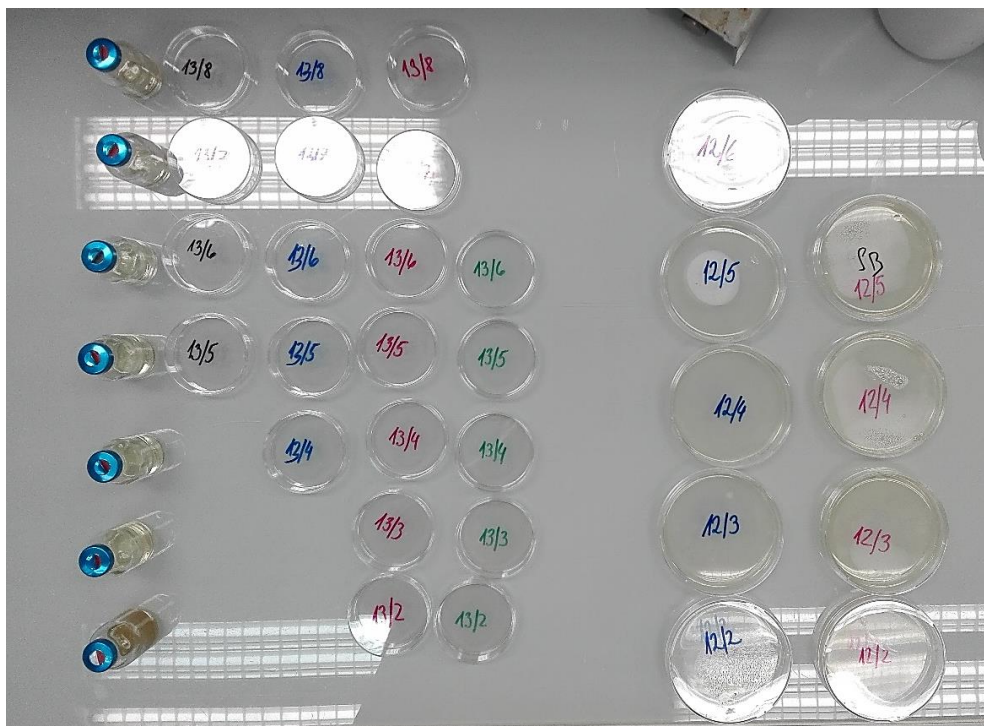
PŘESNÉ DODRŽENÍ POKYŇŮ JE PODMÍNKOU NEZKRESLENÉHO VÝSLEDKU ROZBORU

1. Odběr vzorku proved'te bezprostředně po vykonání potřeby Vašeho psa.
2. Pomocí plastové lžičky odeberte 1 g vzorku.
3. Držte zkumavku ve svislé poloze, tj. červeným uzávěrem směrem nahoru. Zabrání se tak úniku materiálu ze zkumavky (roztok, CO₂).
4. Otevřete červený uzávěr. Za stále svislého držení zkumavky vložte dovnitř odebraný vzorek. Uzavřete zkumavku, co nejpevněji utáhněte uzávěr.
5. Zkumavku s odebraným vzorkem uschovejte v ledničce.
6. Zkumavku dopravte do laboratoře max. do 24 hodin od odběru.

Po odběru 1. vzorku následuje 14 dní krmení určeného doplňku stravy pro psy dle rozpisové tabulky v materiálu „Testování doplňku na trávení“. Po uplynutí této doby se odběr zopakuje dle metodiky uvedené výše.

Děkujeme Vám za spolupráci

Příloha 4: Ředící řada + petriho misky potřebné ke kultivaci jednoho vzorku



Příloha 7: Kultivace ve vhodných podmínkách



Příloha 8: Narostlé kolonie na TBX médiu (*Escherichia coli*)



Příloha 9: Narostlé kolonie na Slanetz & Bartley médiu (*Enterococcus faecium*)

