

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



***Clostridium butyricum* jako probiotikum**

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Veselá

Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "*Clostridium butyricum* jako probiotikum" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Vojtěchu Radovi CSc. za trpělivost a odborné vedení mé bakalářské práce. Dále bych také ráda poděkovala Ing. Romanu Švejstilovi za cenné rady při praktické části mé práce a naučnou spolupráci v laboratoři.

Poděkování patří i mé rodině a blízkým, kterým vděčím za podporu během celého studia.

Clostridium butyricum jako probiotikum

Souhrn

Probiotika jsou dnes definovaná jako živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. Důkazy pozitivních účinků probiotik se velice rychle rozšiřují v oblasti gastroenterologie. Nalézají využití při léčbě průjmů souvisejících s používáním antibiotik, gastroenteritid a intolerance laktózy.

Existuje celá řada různých organismů, které mohou být klasifikovány jako probiotické. Mezi nejčastěji používané patří rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Probiotické vlastnosti však vykazují i klostridie. Stále čtenější jsou zprávy o probiotickém potenciálu *Clostridium butyricum*.

Cílem této studie bylo tedy zhodnotit účinnost Miya-Gold (doplňkové krmivo, které obsahuje životaschopné spory probiotického kmene *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 jako účinnou látku) v oblastech zlepšení konverze krmiva, zvýšení průměrného denního přírůstku a finální tělesné hmotnosti u kuřat na výkrm. Dále se také sledovalo zlepšení stability střevní mikrobioty a mikrobioty volete.

Zjistili jsme, že průměrná hmotnost jedinců ve skupině s přídatkem Miya-Gold, byla statisticky významně vyšší ($P < 0,05$), než v kontrolní skupině ve dnech 7, 10, 20 a 49. Podle analýzy mikrobioty ve 42. dnu byla zjištěna statisticky významně nižší ($P > 0,05$) množství *Escherichia coli* ve slepém střevě a rovněž nižší množství *Escherichia coli* a koliformních bakterií ve voleti. Analýza také prokázala nižší hodnotu pH ve voleti v Miya-Gold skupině.

Dále byla provedena analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem a bylo zjištěno statisticky významně vyšší ($P < 0,05$) množství kyseliny máselné ve slepém střevě u Miya-Gold skupiny.

Výsledky naznačují schopnost Miya-Gold pozitivně ovlivnit výkonnost i střevní mikrobiotu brojlerových kuřat.

Klíčová slova: střevní mikrobiota, probiotika, klostridie, *Clostridium butyricum*, Miya-Gold

Clostridium butyricum as a probioticum

Summary

Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host. Evidence of positive effects of probiotics is rapidly expanding in gastroenterology. Probiotics find use in antibiotic-associated diarrhea, gastroenteritis and lactose intolerance.

Many different strains of bacteria are considered as probiotic, including clostridia. The most used probiotics are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. But there are also suggestions that some *Clostridium butyricum* strains could be also probiotic.

Aim of this study was therefore to evaluate the effectiveness of Miya-Gold (a feed additive containing viable spores of probiotic *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain as an active substance) to the improvement of feed conversion, average daily gain and final body weight in the chickens for fattening and also to observe the improvement of the stability of the gut and crop microbiota.

We found statistically significantly higher ($P < 0.05$) average weights of individuals in Miya-Gold group than in the control group at the day 7, 10, 20 and 49. By the analysis of microbiota we found at the day 42 statistically significantly lower ($P < 0.05$) amounts of *Escherichia coli* in the caecum and *Escherichia coli* and coliform bacteria in the crop and also lower pH in the crop in the Miya-Gold group.

The analysis of short-chain fatty acids was also performed and we found statistically significantly higher ($P < 0.05$) amount of butyrate in the caecum of Miya-Gold group.

The results indicate the ability of Miya-Gold to affect positively the performance and the intestinal microbiota of broiler chickens.

Keywords: intestinal microbiota, probiotics, clostridium, *Clostridium butyricum*, Miya- Gold

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce	8
2.1	Hypotéza	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Střevní mikrobiota	9
3.1.1	Funkce střevní mikrobioty	9
3.1.2	Složení střevní mikrobioty	11
3.2	Probiotika	13
3.2.1	Definice probiotik	13
3.2.2	Požadavky na probiotika.....	14
3.2.3	Vliv probiotik na zdraví hostitele	16
3.2.4	Zástupci probiotik	17
3.3	Klostridie	19
3.3.1	Definice klostridií	19
3.3.2	Zástupci klostridií	20
3.3.2.1	<i>Clostridium difficile</i>	20
3.3.2.2	<i>Clostridium perfringens</i>	20
3.3.2.3	<i>Clostridium tetani</i>	20
3.3.2.4	<i>Clostridium botulinum</i>	21
3.3.2.5	Další druhy.....	22
3.3.3	<i>Clostridium butyricum</i>	22
3.3.4	<i>Clostridium butyricum</i> jako probiotikum.....	23
4	Materiál a metody	25
5	Výsledky	27
6	Diskuze	34
7	Závěr	36
8	Seznam použité literatury	37

1 Úvod

Střevní mikrobiota hraje důležitou roli v lidském zdraví. Mezi její hlavní úkoly patří důležité metabolické funkce, ochrana proti patogenům a stimulace vývoje imunitního systému. Střevní mikrobiota představuje důležitý faktor také v metabolismu nestravitelných sacharidů, některých oligosacharidů, neabsorbovaných cukrů a cukerných alkoholů ze stravy. Výsledkem těchto metabolických funkcí je rovněž získání energie a živin pro růst bakterií a jejich proliferaci.

Probiotika jsou dnes definována jako živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele. Co se týče probiotik, byla původní myšlenka vždy založena na modulaci střevní mikrobioty z potenciálně škodlivého složení na mikrobiotu, která bude prospěšná pro hostitele. Nalézají využití při léčbě průjmů souvisejících s používáním antibiotik, gastroenteritid a intolerance laktózy. Probíhá rovněž výzkum významu probiotik při léčbě zánětlivých onemocnění střev a střevních infekcí. V rámci probiotik jsou nejčastěji používány rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Probiotické vlastnosti však vykazují i klostridie, což jsou Gram-pozitivní anaerobní bakterie. Potenciál klostridií je v dnešní době hojně využíván také v mikrobiologii a průmyslové biotechnologii. Buňky bakterií rodu *Clostridium* jsou mobilní a mají schopnost tvořit endospory.

Stále čtenější jsou zprávy o probiotickém potenciálu *Clostridium butyricum*. *Clostridium butyricum* produkuje kyselinu máselnou. Tato bakterie zvyšuje koncentrace máselné kyseliny v celé délce tráveniny ptáků. Důležitost kyseliny máselné spočívá zvláště ve výživě epitelových buněk a inhibici patogenů ve střevě. *Clostridium butyricum* patří mezi dobré doplňkové látky díky své odolnosti i při nízkém pH a vysokých teplotách.

2 Cíl práce

Cílem práce je zhodnotit vliv Miya-Goldu na střevní mikrobiotu a užítkovost brojlerů.

2.1 Hypotéza

Hypotéza je, že jedinci živení krmivem s přídavkem Miya-Goldu budou rychleji růst a stabilizuje se jejich střevní mikrobiota.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota

Stejně jako ostatní savci jsou i lidé spojeni s komplexní mikrobiální komunitou po celou dobu vývoje. Mikrobi, kteří obývají povrch epitelů a trávicího traktu člověka desetkrát převyšují počet lidských buněk. Nejvyšší množství a tím pádem i rozmanitost mikrobů se vyskytuje v tlustém střevě, kde žijí stovky mikrobiálních druhů. Tyto druhy obsahují stokrát více genů, než má lidský genom (Hooper a Gordon, 2001).

3.1.1 Funkce střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota hraje důležitou roli v lidském zdraví. Mezi její hlavní úkoly patří důležité metabolické funkce, ochrana proti patogenům a stimulace vývoje imunitního systému (Guarner a Malagelada, 2003).

Vzhledem k tomu, že střevní bakterie dokážou zakódovat podstatně větší počet genů, než buňky lidského hostitele, jsou tím pádem schopny provádět celou řadu metabolických funkcí, kterých lidský organismus není schopen vůbec nebo pouze v omezené kapacitě. Střevní bakterie produkují celou řadu vitamínů, ovlivňují střevní peristaltiku, syntetizují esenciální a neesenciální aminokyseliny a v neposlední řadě provádí biotransformaci žluči (Vyas a Ranganathan, 2012).

Střevní mikrobiota představuje důležitý faktor také v metabolismu nestravitelných sacharidů (rezistentní škrob, celulóza, hemicelulóza, pektiny), některých oligosacharidů, neabsorbovaných cukrů a cukerných alkoholů ze stravy (Cummings et al., 1987). Výsledkem těchto metabolických funkcí je rovněž získání energie a živin pro růst bakterií a jejich proliferaci (Guarner a Malagelada, 2003). Mezi nejhojnější bakteriální enzymy podílející se na degradaci polysacharidů a xenobiotik jsou beta- glykosidasy a beta- glukuronidasy, které mohou být prospěšné, ale mohou mít i škodlivé účinky (Dabek et al., 2008). Glykosidasy přítomné v lidské mikrobiotě přispívají k využití živin a v některých případech ke vzniku biologicky aktivních aglykonů, například z isoflavonů. Využitím komplexních polysacharidů dochází k příjmu energie z potravy, který zastupuje až 10% celkové denní energetické zásoby (Flint et al., 2008).

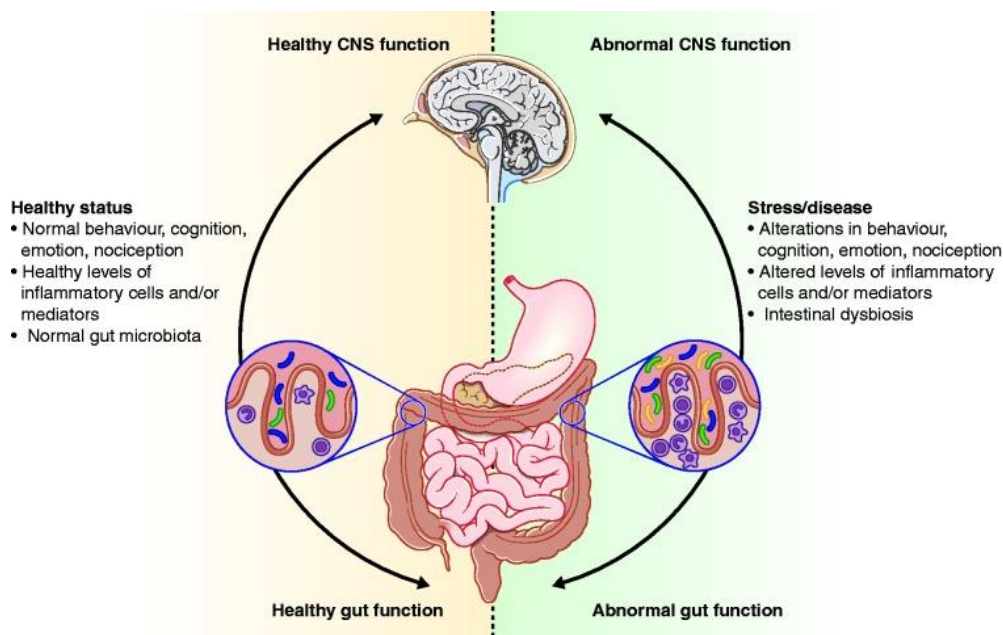
Fermentace polysacharidů také vede ke vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem, zejména acetátu, propionátu a butyrátu. Všechny tyto mastné kyseliny hrají důležitou funkci ve fyziologii hostitele (Cummings et al., 1987). Jejich úloha spočívá ve výživě střevního

epitelu a změně intracelulární pH. Další funkce mastných kyselina s krátkým řetězcem jsou spojené s transportem iontů a regulací proliferace, diferenciaci a genové exprese (Cook a Sellin, 1998).

Střevní bakteriální enzymy se také podílejí na metabolismu cholesterolu a žlučových kyselin. Cholesterol může být komenzální mikrobiotou redukován na koprostanol, čímž se zvyšuje jeho vylučování stolicí. Žlučové kyseliny jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech většinou jako primární žlučové kyseliny, kyselina cholová a kyselina chenodeoxycholová. Činnostmi střevních bakterií jsou tyto kyseliny dekonjugací a následnou dekarboxylací převedeny na sekundární žlučové kyseliny, čímž se omezuje rozpustnost a absorpce lipidů ve střevě (Ridlon et al., 2005). Nicméně, tyto činnosti mohou také vést ke vzniku sekundárních žlučových kyselin, jako například kyseliny deoxycholové a kyseliny lithocholové, které jsou považovány za možné karcinogeny. *Bacteroides intestinalis* a sekundárně i *Bacteroides fragilis* a *Escherichia coli* se mohou podílet na tvorbě sekundárních žlučových kyselin v tlustém střevě (Fukiya et al., 2009).

Rezidentní střevní bakterie tvoří linii odolnou vůči kolonizaci exogenními mikrobi a jsou tudíž velmi důležité při prevenci invaze tkání patogeny. Zvířata bez těchto bakterií jsou velmi citlivá na infekci (Baba et al., 1991; Taguchi et al., 1997). Bariérový efekt tvoří několik mechanismů. Nepatogenní bakterie soutěží o upevňovací místa na buňkách střevního epitelu a tím zabraňují uchycení a následnému vstupu patogenů do epiteliálních buněk (Bennett et al., 1994). Hostitelský organismus aktivně poskytuje živiny, které potřebují bakterie a bakterie naopak udávají, kolik živin spotřebuje hostitel. Tento symbiotický vztah zabraňuje nežádoucí nadprodukci živin, která by umožnila vniknutí mikrobiálních konkurentů s potenciální patogenitou pro hostitele. Další mechanismus, který střevní bakterie využívají je produkce antimikrobiálních látek (bakteriocinů), kterými inhibují růst svých konkurentů (Brook, 1999; Lievin et al., 2000). Slizniční bariéra však nebrání interakci mezi mikrobiální flórou a imunitní systémem, jak se dřívější studie domnívaly. Ve skutečnosti se jedná o běžně se objevující a nezbytnou interakci v lidském organismu (Rakoff-Nahoum et al., 2004; Macdonald a Monteleone, 2005).

Vliv střevní mikrobioty není omezen pouze na gastrointestinální trakt. Studie ukazují úzký vztah mezi mikroorganismy a vývojem a regulací nervového systému (Sudo et al., 2004; Brain, 1997; Ait-Belgnaoui, 2012). Tato interakce je umožněna schopností mikrobů uvolnit produkty, které pak působí na funkce nervového systému (Cryan a Dinan, 2012; Silverman a E. M. Sternberg, 2012; Sternberg, 2001; Aston-Jones, 1986). Mikrobiota může tedy ovlivnit chování, emoce, a úzkost ve stresových situacích (Cryan a Dinan, 2012).



Obr. 1. Dopad střevní mikrobioty na osu střevo- mozek ve zdraví i v nemoci (Cryan a Dinan, 2012).

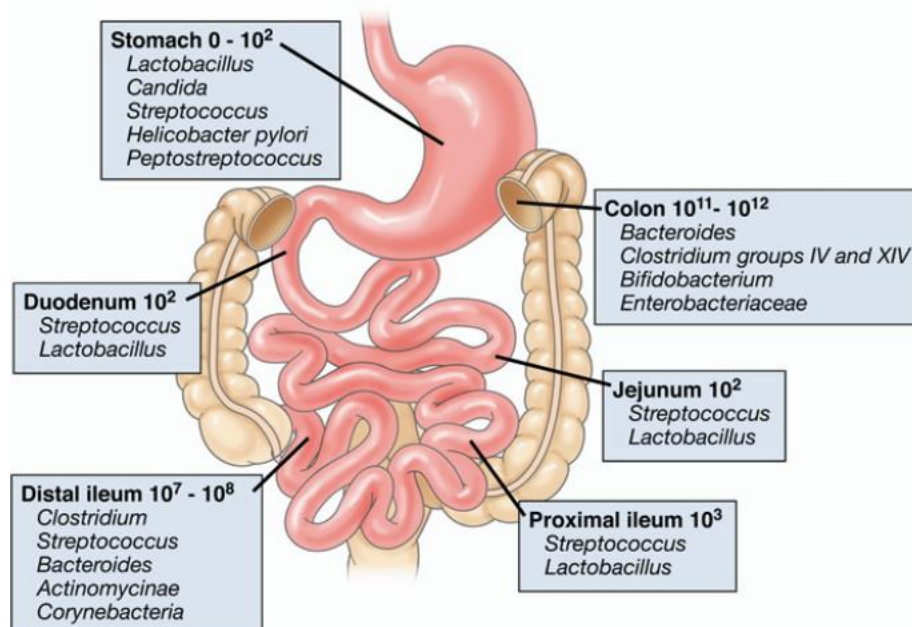
Endotoxiny a mikrobiální expozice v raném dětství mohou hrát klíčovou roli při utváření imunitního systému a tím i vývoj alergií (Gehring et al., 2002; Tse a Horner, 2008). Hygienická hypotéza posunula výzkum v oblasti přirozené mikrobioty a mikrobiální infekce v souvislosti s regulací alergické citlivosti. Studie prokázaly, že zvýšená kolonizace druhů z rodu *Bifidobacterium* během raného dětství je spojena se sníženým rizikem vzniku alergických onemocnění prostřednictvím zvýšené humorální imunity, zatímco nižší kolonizace některých laktobacilů, bakterie *Bifidobacterium adolescentis* a vyšší kolonizace *Clostridium difficile* může riziko alergie zvýšit (Sjögren et al., 2009).

3.1.2 Složení střevní mikrobioty

Gastrointestinální trakt člověka je tvořen komplexním ekosystémem, který se skládá z mikrobů, kteří se vyvíjeli spolu se svým hostitelem a jsou tedy vysoce přizpůsobiví této ekologické nische (Bäckhed et al., 2005). Ačkoli mechanismy pro vývoj střevní mikrobioty nejsou zcela objasněny, výsledný ekosystém je unikátní pro každý subjekt a je ovlivněn jak genetikou, tak životním prostředím (Zoetendal et al., 2001; Turnbaugh et al., 2009). Ekosystém tlustého střeva obsahuje více než 400 bakteriálních druhů, které patří do širokých taxonomických skupin (Eckburg et al., 2005).

Rozložení střevní mikrobioty se liší podle tří hlavních lokalit v zažívacím traktu. V žaludku se nachází 10^2 jednotek tvořících kolonie (CFU) / ml, zahrnujících laktobacily a

streptokoky a případně i *Helicobacter pylori*. Tenké střevo obsahuje na začátku 10^2 - 10^3 CFU / ml bakterií a s přibývajícím délkou se počet zvyšuje až na 10^8 v části distální, kde lze nalézt například *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp. a bakterie rodu *Bacteroides*. Tlusté střevo, jak už bylo řečeno, hostí největší část mikrobiální populace v těle. Jedná se o 10^{10} - 10^{12} KTJ /ml (DiBaise et al., 2008).



Obr. 2. Zastoupení bakterií v gastrointestinálním traktu člověka (Sartor, 2008).

Kompozice střevní mikrobioty je sice u každého jedince odlišná, ale přesto jsou v této oblasti vymezeny takzvané enterotypy. První enterotyp se vyznačuje vysokým zastoupením bakterií rodu *Bacteroides*. Vyšší obsah bakterií z rodu *Prevotella* má druhý enterotyp. Lidé zastupující třetí enterotyp mají ve střevním mikrobiomu hojně zastoupeny bakterie rodu *Ruminococcus*. Tyto tři skupiny bakterií se liší také podle převažujícího zdroje jejich energie. *Bacteroides* spp. využívají především sacharidy, *Prevotella* spp. muciny a *Ruminococcus* spp. muciny a cukry (Arumugam et al., 2011). Enterotypy jsou úzce propojeny s dlouhodobou dietou hostitele (Wu et al. 2011).

První kolonizátoři trávicího traktu jsou odvozeni od matky novorozence, životního prostředí a stravy. Během této rané fáze života dochází k velkým změnám ve složení střevní mikrobioty (Mitsuoka, 1992; Favier et al., 2002; Palmer et al., 2007). Při narození jsou střeva novorozence sterilní. Během několika málo hodin se začnou bakterie objevovat v trávicím traktu. Při narození vykazuje střevní prostředí novorozenců pozitivní oxidačně-redukční potenciál, tudíž je gastrointestinální trakt nejprve obýván fakultativně anaerobními bakteriemi (*Enterococcus* spp. a *Streptococcus* spp.). Vzhledem ke spotřebě kyslíku těmito bakteriemi se postupně mění prostředí a umožňuje růst striktně anaerobních bakterií (Bezirtzoglou, 1997).

S postupem času anaerobní druhy kolonizují střevo jedince a fakultativně anaerobní bakterie se dostávají do menšiny (100- 1000: 1 u dospělých). Toto období koresponduje se zavedením pevných potravin do stravy. Z toho vyplývá, že dosažením prvního roku dítěte začíná střevní mikrobiota směřovat ke vzoru dospělého jedince (Mackie et al., 1999; Palmer et al., 2007)

Bylo zjištěno, že většinu dospělé střevní mikrobiální komunity člověka tvoří zástupci anaerobních rodů *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus* a *Faecalibacterium*. Přesto je ale mikrobiální komunita u každého dospělého jedince jedinečná a její struktura zůstává stabilní v časovém měřítku několika měsíců (Ley et al., 2006; Eckburg et al., 2005; Zoetendal et al., 1998).

Studie zabývající se složením mikrobioty u starších lidí se mnohdy liší. Některé studie pozorovaly ve srovnání s mladšími dospělými nižší hladinu rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* u starších pacientů. Počty rodu *Bacteroides*, enterokoků, enterobakterií a klostridií se od mladších dospělých nelišily (Hopkins et al., 2001). Jiné studie vyzkoumaly vyšší výskyt rodu *Ruminococcus* a nižší výskyt rodů *Eubacterium* a *Bacteroides* u starších pacientů ve srovnání s mladšími dospělými (He et al., 2003). Starší pacienti mají také obecně sníženou funkci imunitního systému. Výsledek této změny může mít vliv na složení střevní mikrobioty (Gill et al., 2001).

3.2 Probiotika

3.2.1 Definice probiotik

Termín probiotikum pochází z řeckého jazyka a přeneseně znamená „pro život“. Poprvé této termín použili v roce 1965 Lilly a Stillwell. Jejich popis zněl: „Substance vylučovaná jedním mikroorganismem, stimulující růst jiného organismu (Lilly a Stillwell, 1965).“. Pojem probiotikum byl v tu dobu nesprávně porovnáván s pojmem antibiotikum. Poté vznikaly mnohé úpravy vysvětlení pojmu probiotik, ale nejvýznamnější byla Fullerova definice, která zní „Probiotika jsou živé mikrobiální krmné a potravní doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenózy“ (Fuller, 1989). Dnešní definice probiotik má tuto formu: „Probiotika jsou živé mikroorganismy, které jsou-li podávány v adekvátním množství, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele.“ (Hill et al., 2014). Studie jsou však stále komplikovanější, co se týče získání statisticky reprezentativního vzorku. Řeší se především vhodná kombinace sloučení druhů a kmenů do jednoho produktu.

Během posledních několika desetiletí bylo vyvinuto mnoho nových produktů obsahující probiotika, které byly dodány na evropský trh. Produkty lze podle Bernera a O'Donnella (1998) a Sanderse a Velda (1999) rozdělit do tří hlavních kategorií:

- konvenční potraviny, jako jsou fermentované výrobky s přidavkem probiotických bakterií, využívané zejména pro nutriční účely
- potravinové doplňky nebo fermentovaná mléka, které jsou nejčastěji používané pro transport probiotických bakterií
- dietní doplňky, například ve formě kapslí, pro zdravé jedince

Tyto produkty obvykle obsahují vybrané kmeny bakterií, které jsou všeobecně považované za bezpečné (Generally Recognised As Safe- GRAS), což jsou zejména bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Bianchi Salvadori, 1998; Sanders a Veld, 1999).

Mezi produkty, které obsahují probiotické bakterie, patří nejčastěji funkční potraviny, včetně mléčných produktů, jako jsou jogurty, sýry, zmrzlina a máslo (Soccol et al., 2010) a mražené krémy (Buriti et al., 2010). Dále se nacházejí i v nemléčných výrobcích, například ve výrobcích z obilovin, pokrmech pro děti a sójových výrobcích (Singh et al., 2010). Probiotika jsou také využívána při zpracování ovoce a zeleniny do podoby nápojů, pyré, zavařené zeleniny, stolních oliv (Peres et al., 2012). Trh s produkty obsahující probiotické bakterie se stále rozšiřuje v důsledku poptávky spotřebitelů, kteří vidí možné zdravotní výhody (Champagne et al., 2011). Rozšiřování mlékárenského průmyslu vede k zavedení mléčných výrobků, vyráběných kombinací mléčného a ovocného nápoje, které by byly zdravější a svěží (Khurana a Kanawjia, 2007).

3.2.2 Požadavky na probiotika

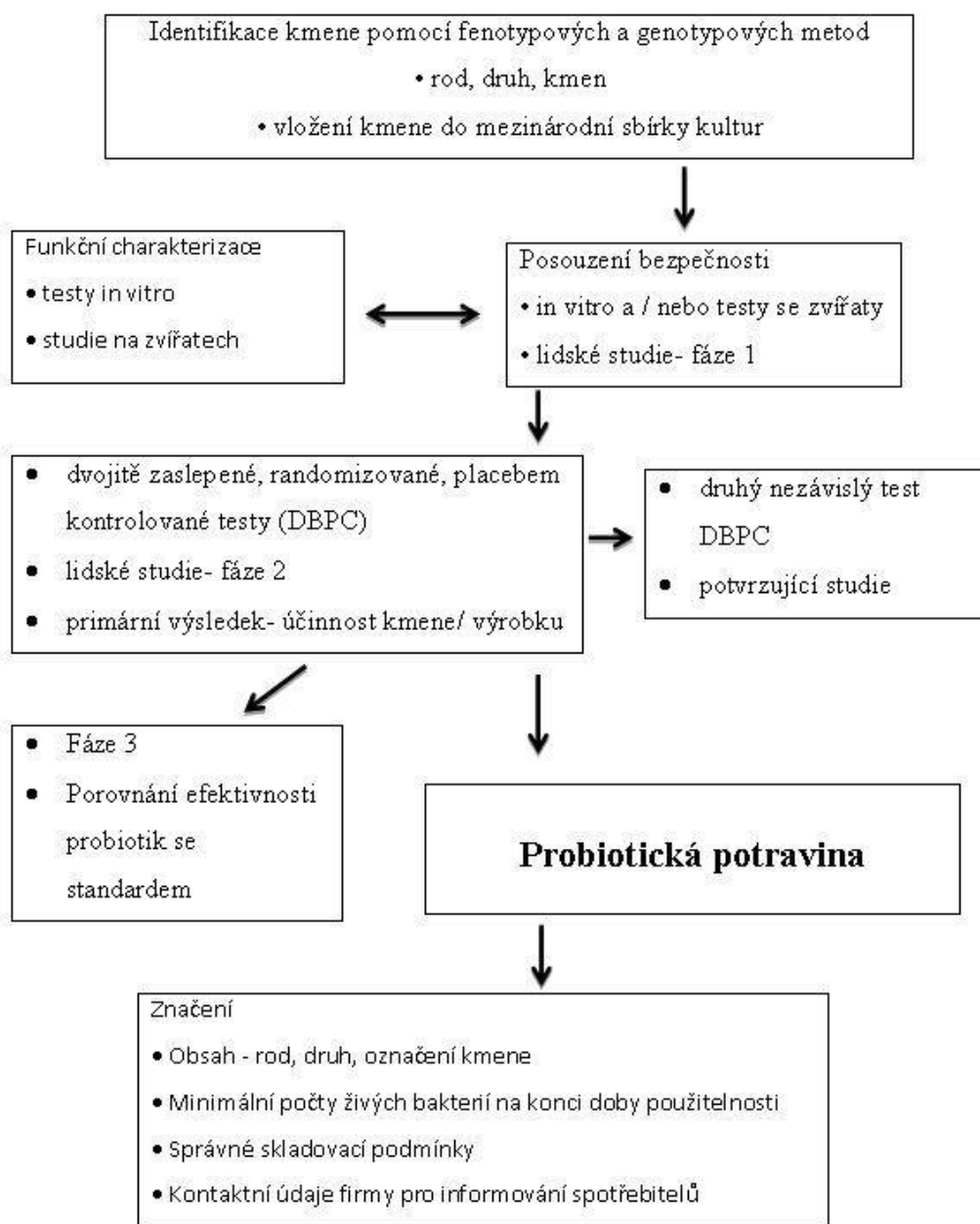
Mezi kritéria určující zdali má bakterie probiotické účinky patří následující ukazatelé:

- Probiotické bakterie by neměly být patogenní a toxické.
- Dále by měly být odolné vůči žaludečním kyselinám a žluči.
- Měly by mít schopnost adheze na střevní epitel a produkce antibakteriálních látek.
- Probiotické bakterie by měly být schopny přežívat v gastrointestinálním traktu a tím ovlivňovat metabolické aktivity, jako je cholesterolová asimilace, přeměna sacharidů a výroba vitaminů. Přežití probiotických organismů ve

střevě závisí na kolonizačních faktorech, které jim umožní odolávat antibakteriálním mechanismům, které působí ve střevech.

- Kromě antibakteriálních mechanismů musí probiotika odolávat i peristaltickým účinkům, které mají tendenci odplavovat bakterie spolu s jídlem. Toho lze dosáhnout buď imobilizací - například přichycením k epitelu nebo zvýšením rychlosti růstu (Suvarna a Bobby, 2005).

Doporučené pokyny hodnocení probiotik při využití v potravinách jsou shrnuty v následujícím schéma (FAO/WHO, 2002).



3.2.3 Vliv probiotik na zdraví hostitele

Co se týče probiotik, byla původní myšlenka vždy založena na modulaci střevní mikrobioty z potenciálně škodlivého složení na mikrobiotu, která bude prospěšná pro hostitele. Obecně by to znamenalo například snížení počtu koliformních bakterií a klostridií a zvýšení počtů laktobacilů a bifidobakterií. Probiotika, která jsou schopna přežít v gastrointestinálním traktu, způsobují nárůst množství téhož bakteriálního rodu ve stolici, zejména pokud byly počáteční hladiny ve stolici nízké. Mohou ovlivnit kompetici o adhezni místa a produkovat antimikrobiální látky, a tím pádem snížit hladiny některých nežádoucích rodů (Ouwehand et al., 2002). Za komplexní bakteriostatické a baktericidní účinky probiotik je považována produkce kyseliny mléčné a antimikrobiálních peptidů (Oláh a Romics, 2014).

Důkazy pozitivních účinků probiotik se velice rychle rozšiřují v oblasti gastroenterologie. Nalézají využití při léčbě průjmů souvisejících s používáním antibiotik, gastroenteritid a intolerance laktózy. Probíhá rovněž výzkum významu probiotik při léčbě zánětlivých onemocnění střev a střevních infekcí (Marteau et al., 2002). Při užívání antibiotik odborníci často doporučují současnou konzumaci probiotik jako prevenci u rizikových jedinců, například u starších jedinců, dále u pacientů užívajících několik antibiotik najednou a vhodné jsou i pro jedince, kteří měli již dříve střevní problémy související s užíváním antibiotik (Bergogne-Berezin, 2000).

Poruchy s trávením laktózy jsou časté u dospělých jedinců s akutním či chronickým zánětem střev či resekci střev. Marteau et al. (1997) poprvé dokázali zmírnění nesnášenlivosti laktózy účinkem probiotik. Nejlépe průkazné výsledky byly nalezeny u jogurtových bakterií, obsahujících vysoké množství laktázy, která se rychle uvolňuje, pokud jsou bakterie štěpeny pomocí solí žlučových kyselin v gastrointestinálním traktu (Marteau et al., 1990). Ostatní probiotika obsahující laktázu, například *Lactobacillus acidophilus*, jsou také aktivní, ale jejich nižší efektivnost je vysvětlována vyšší odolností vůči žlučovým kyselinám (Marteau et al., 1997).

Endogenní oblast mikrobioty a imunitní systém ovlivňují kancerogenezi a některá probiotika jsou účinná při prevenci nebo napomáhají při léčbě nádorů. Některé studie prokázaly, že probiotika mohou snižovat fekální hladiny enzymů, mutagenů a sekundárních žlučových kyselin, které jsou zapojeny v kancerogenezi tlustého střeva (Wollowski et al., 2001).

3.2.4 Zástupci probiotik

Mikroorganismy používané jako probiotika jsou shrnuty v následující tabulce (upraveno podle Fuller, 1989; Ouwehand et al., 2002).

Bakterie mléčného kvašení	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp., <i>Bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Bifidobakterie	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. pseudolongum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. thermophilum</i>
Ostatní bakterie	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. toyoi</i> <i>B. natto</i> , <i>B. mesentericus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Clostridium butyricum</i>
Mikroskopické houby	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Candida pintolopesii</i>

Tabulka 1. Mikroorganismy používané jako probiotika.

Existuje celá řada různých organismů, které mohou být klasifikovány jako probiotické. Mezi nejvíce používané patří rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. U laktobacilů se jedná o kmeny *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus reuteri*. Probiotické bakterie z rodu *Bifidobacterium* jsou *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium infantis* (Pandey et al., 2015). Laktobacily a bifidobakterie jsou obecně považovány za bezpečné potravinové doplňky s deklarovanými zdravotními pozitivy (Haukioja, 2010). V mnoha tradičních potravinách hrají tyto bakterie důležitou roli při prevenci kažení a růstu patogenních mikroorganismů (Hammes a Tichaczek, 1994).

Bifidobakterie jsou globálně používány jako probiotika v mnoha potravinářských výrobcích, například v jogurtech, mléku, kojenecké výživě, sýrech a potravinových doplňcích (Champagne et al., 2005; Charalampopoulos et al., 2002; Mattila-Sandholm et al., 2002;

Vinderola et al., 2000). Jako probiotika jsou bifidobakterie používány velice dlouhou dobu a je zjištěno, že riziko infekce je velmi nízké (Gasser, 1994; Ouwehand et al., 2002). Byly provedeny studie pro stanovení účinku časně orální suplementace probiotických bifidobakterií u předčasně narozených dětí. Tyto studie ukázaly, že včasné doplnění redukuje dobu usídlení bifidobakterií v nezralém střevu (Marquez et al., 2010). Rychlé vytvoření zdravé střevní mikrobioty u předčasně narozených dětí je důležité pro slizniční obranu hostitele a prevenci některých střevních infekcí (Dai a Walker, 1999). Mezi další účinky těchto bakterií, jak už bylo řečeno v obecných probiotických funkcích, patří stimulace imunitního systému, dále redukce cholesterolu, ovlivnění intolerance laktózy a v neposlední řadě prevence v rámci nádorů a infekcí (Lee a O'Sullivan, 2010).

Rod *Lactobacillus* má též dlouhou historii bezpečného používání, zejména v mlékárenském průmyslu a hraje hlavní roli ve výrobě zakysaných mléčných výrobků (Maragkoudakis et al., 2006). Účinky rodu *Lactobacillus* jsou obdobné jakou u rodu *Bifidobacterium*. Dále také slouží laktobacily k inhibici patogenních organismů, jako je *Salmonella*, *Shigella* a *Helicobacter* (Bernet-Camard et al., 1997; Hudault et al., 1997; Aiba et al., 1998; Hammilton-Miller, 2003; Sgouras et al., 2004).

Mnohá probiotika byla používána pro jejich prospěšné funkce již dlouho před tím, než byl termín „probiotikum“ vytvořen. Nejčastěji používané probiotické kmeny jsou bakterie mléčného kvašení (LAB), gram-pozitivní mikroorganismy, které byly používány po staletí při výrobě potravin, například jogurtu, sýru, nebo nakládané zeleniny. Zástupci LAB, jako jsou rody *Lactococcus* a *Streptococcus*, jsou také důležitou součástí endogenní mikrobioty v lidském ileu a jejunu a v menší míře také tlustého střeva (Hayashi et al., 2005). Nejpoužívanější LAB je druh *Lactococcus lactis* díky produkci cytokinů. Na rozdíl od jiných druhů laktokoků je tato bakterie pouze přechodně přítomná v lidském střevě a je tedy klasifikována jako nekomenzální (Nouaille et al. 2003).

Pokud jde o gram-negativní probiotika, je nejčastěji používán kmen *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Tento kmen byl poprvé pozorován během první světové války, kdy byl izolován z výkalů jednoho vojáka, u kterého nedošlo k vyvinutí infekčního průjmu během epidemie v důsledku vysoce nakažlivé bakterie z rodu *Shigella*. Nissleovo pozorování naznačovalo, že EcN by mohla poskytovat sliznici odolnost vůči patogenům. V souladu s touto hypotézou byly prováděny mnohé studie, které dokázaly probiotické účinky a biologickou bezpečnost EcN, což potvrzuje dlouhá anamnéza ve Střední Evropě, kde je používána v humánní medicíně (Kruis et al., 1997; Westendorf et al., 2005; Henker et al.,

2007). V současné době je EcN je obsažena v léku Mutaflor, který se používá k léčbě infekčních průjemových onemocnění a zánětlivých střevních onemocnění (Schutz, 1989).

3.3 Klostridie

3.3.1 Definice klostridií



Obr. 3. *Clostridium butyricum*. Foto pomocí mikroskopu Nikon Eclipse E200 s kamerou Nikon DS-Fi2, zvětšení 15×40 (foto Švejtil).

Rod *Clostridium* v současné době zahrnuje přes 200 popsáných druhů, z nichž většina byla identifikována na základě sekvenční analýzy 16S rDNA. Sekvenční analýza genu 16S rRNA má velkou roli v oblasti mikrobiální taxonomie, identifikace a studiu evoluce bakterií (Sapp, 2005). Potenciál těchto mikroorganismů je v dnešní době hojně využíván v mikrobiologii a průmyslové biotechnologii. Mezi často aplikované mikroorganismy v různých průmyslových odvětvích patří právě bakterie rodu *Clostridium* (Zhang et al., 2009; Wang et al., 2011; Wilkens et al., 2011; Kaur et al., 2012; Metsoviti et al., 2012). Rod *Clostridium* je jedním z největších rodů v rámci Prokaryot. Jedná se o Gram-pozitivní anaerobní bakterie. Jejich charakteristickým znakem je válcový tvar. Buňky bakterií rodu *Clostridium* jsou mobilní a mají schopnost tvořit endospory (Bahl a Durre, 2001). Pro většinu druhů je optimální teplota růstu v rozmezí 30 až 40 °C, díky sporulaci jsou ale schopny přežít i vyšší teploty. Optimální hodnota pH se pohybuje v rozmezí 6,5-7,5. Bakterie rodu *Clostridium* se běžně vyskytují v přírodě. Za jejich hlavní stanoviště se považují půdy, řeky, kaly, živočišné výkaly, atd. (Schlegel, 1993; Bahl a Durre, 2001).

3.3.2 Zástupci klostridií

3.3.2.1 *Clostridium difficile*

Jedná se o gram-pozitivní, sporulující, striktně anaerobní bakterie. Tyto bakterie jsou jednou z hlavních příčin průjmu v důsledku užívání antibiotik (Kelly and LaMont, 2008). Léčba antibiotiky narušuje normální střevní flóru, která obvykle potlačuje růst *Clostridium difficile*, čímž dojde k nárůstu a přemnožení tohoto druhu v gastrointestinálním traktu (Surawicz a McFarland, 1999; Britton a Young, 2014). Poté, co se usídí gastrointestinálním traktu, *Clostridium difficile* vylučuje dva toxiny, enterotoxin TcdA (*Clostridium difficile* toxin A) a cytotoxin TcdB (*Clostridium difficile* toxin B), které silně poškozují střevní epitel a mohou také vyvolat zánětlivé reakce (Rupnik et al., 2009). Během vývoje v gastrointestinálním traktu dochází k transkripci, která vede k tvorbě endospor (Janoir et al., 2013). Pro *Clostridium difficile* je vytvoření spor nezbytné z důvodu přežití při opuštění hostitele a přenášení nemoci, jelikož jeho vegetativní buňky jsou velmi citlivé na kyslík. (Deakin et al., 2012). Spory *Clostridium difficile* jsou odolné nejen vůči antibiotikům, ale také vůči působení imunitního systému hostitele (Paredes-Sabja, 2012) a dezinfekčním prostředkům, které se používají v nemocnicích. Tato odolnost vychází z jejich metabolické dormance a vnitřních odporových vlastností (Ali et al., 2011; Barra-Carrasco et al., 2013; Permpoonpattana et al., 2013; Lawley et al., 2010).

3.3.2.2 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens se běžně vyskytuje v životním prostředí, ve střevech člověka i zvířat (domácích i divokých). Zdroj infikovaných organismů může být endogenní, méně často pak exogenní. Tyto patogenní bakterie jsou nepochybně nejvýznamnější příčinou klostridiových onemocnění u domácích zvířat (Duchesnes et al., 2006). *Clostridium perfringens* se dělí do pěti typů (A, B, C, D a E) podle toho, který toxin produkují. Typ A produkuje alfa- toxin; typ B produkuje alfa, beta a epsilon toxin; typ C produkuje alfa a beta toxiny; typ D alfa a epsilon toxiny; typ E produkuje alfa a iota toxiny (Rainey et al., 2009).

3.3.2.3 *Clostridium tetani*

Spory *Clostridium tetani* se vyskytují po celém světě v horních vrstvách půdy a v trávicím systému lidí a některých zvířat. Vyšší výskyt je pozorován v půdách, na kterých

dochází k časté manipulaci, tudíž v okolí měst a na kultivovaných půdách. Bakterie roste nejlépe při teplotě 37 °C, takže v polárních oblastech a v oblastech s vyšší nadmořskou výškou se nalézají velmi zřídka. Spory jsou odolné vůči antiseptickým účinkům i vysoké teplotě (Duchesnes et al., 2006). K usmrcení spor je potřeba udržovat bod varu alespoň po 4 hodiny nebo 12 minut v autoklávu při teplotě 121°C (Bartlett, 2000). Inkubační doba tetanu je vysoce proměnlivá (2 až 56 dní), častěji jsou hlášeny případy s kratší dobou (méně než 14 dní). Kratší doba inkubace odpovídá více závažným onemocněním (Bleck, 2000). Prvními příznaky jsou neklid, podrážděnost, bolesti svalů, nadměrné pocení, slintání a bolesti při otevírání úst (Duchesnes et al., 2006). Tetanus nevyvolává imunizaci, jelikož množství produkovaného toxinu je nízké. Proto je nutná vakcinace i po skončení nemoci (Bleck, 2000). Bez lékařské pomoci většinou nastává smrt. V České republice je proti tetanu zavedeno plošné očkování.

3.3.2.4 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum je souhrnným názvem pro komplex čtyř druhů, které jsou navzájem fyziologicky a fylogeneticky odlišné a měly by být považovány za druhy odlišné. Jednotlivé kmeny jsou schopné produkovat jeden nebo dva ze sedmi antigenně odlišných typů toxinů (A až G). U lidí jsou nebezpečné pouze typy A, B, E a F (Duchesnes et al., 2006). Už množství 30 ng může mít pro lidský organismus fatální následky (Peck, 2004). Duchesnes et al. (2006) rozlišují tři formy botulismu podle způsobu kontaminace:

- Potravinový (alimentární) botulismus, který nastává v důsledku požití potravy obsahující toxin; jídlo může být kontaminováno bakteriemi (jotka), nebo s větší pravděpodobností sporami (prach, nečistá voda), které mohou za určitých podmínek klíčit.
- Kojenecký botulismus, který se vyskytuje u dětí do jednoho roku, pokud je střevo kontaminováno požitím spor; nerozvinutá střevní mikrobiota umožní vegetativní růst a tvorbu toxinu; spory se nejčastěji vyskytují v půdě a medu, z toho plyne, že med není vhodné podávat dětem před dosažením jednoho roku života.
- Ranný botulismus je, stejně jako tetanu, důsledkem kontaminace ran sporami; kontaminaci ran klostridii a následný rozvoj závažné infekce byly doposud zvláště důsledkem zranění z válek (Brazier et al., 2002); plynatá sněť (klostridiální myonekróza) byl hlavní problém v zákopové válce během první světové války; hluboké rány byly běžně kontaminované zeminou a stolicí, což znamenalo hned dva

zdroje kontaminace sporami (MacLennan, 1962); v dnešní době jsou známy případy botulismu u drogově závislých, kteří užívají drogy nitrožilně, tyto případy jsou stále čtenější v mnoha zemích EU

Druhy produkující botulotoxin se vyskytují po celém světě ve sladké i slané vodě, půdě, jezerech i v mořských sedimentech. Také se nalézají v trávicím systému zvířat a mohou tak kontaminovat masné výrobky na jatkách (Duchesnes et al., 2006). Pozitivní využití botulotixinu se uplatňuje v lékařství (zmírnění neurologických symptomů) a v kosmetice (snížení výskyt mimických vrásek) (Schlegel, 1993; Ting a Freiman, 2004).

3.3.2.5 Další druhy

Clostridium butyricum, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium diolis*, *Clostridium acetobutylicum* a *Clostridium perfringens* se podílejí na biotransformačních procesech (Colin et al, 2000; Hao et al, 2008). Výše uvedené bakteriální kmeny jsou schopny přeměny glycerolu na 1,3-propandiol (Kubiak et al., 2012).

Další druh velkým přínosem pro toto odvětví je *Clostridium thermocellum*, což je anaerobní termofilní bakterie schopná převádět odpadní celulózu na ethanol (Colin et al., 2000; Demain et al., 2005; Ezeji et al., 2007; Ren et al., 2007; Leja et al, 2011.; Song et al, 2011.; Kubiak et al., 2012).

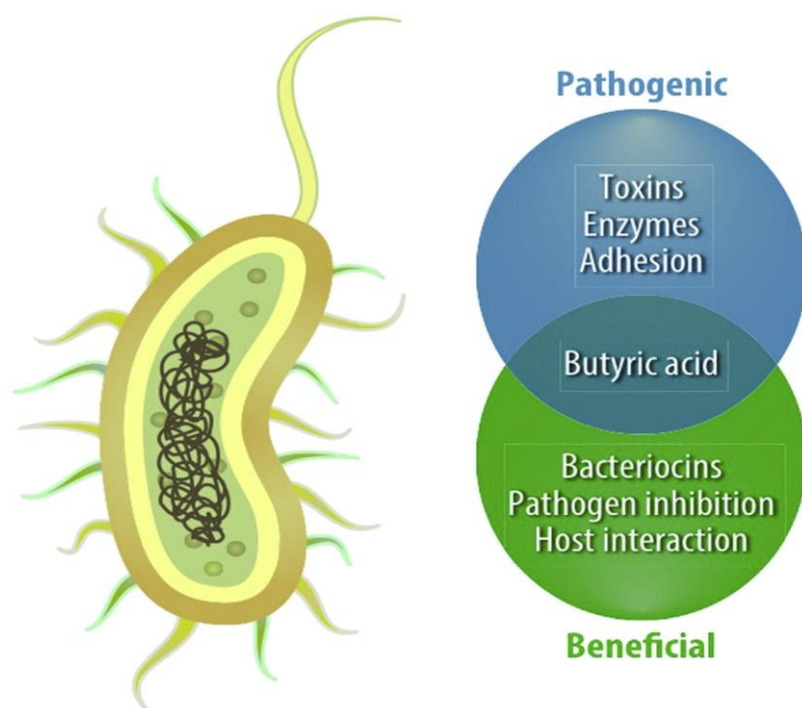
Clostridium acetobutylicum a *Clostridium butyricum* produkují vodík fermentací cukrů - glukosy, sacharosy a laktosy (Oh et al., 2009; Beckers et al., 2010).

3.3.3 *Clostridium butyricum*

Jedná se o gram- pozitivní rovné tyčinky se zaoblenými konci o velikosti 0,5-1,7 × 2,4- 7,6 μm. Mají schopnost pohybu. Vyskytují se jednotlivě, v párech nebo v krátkých řetězcích, případně i jako dlouhá vlákna. Spory jsou oválné, centrálně či subterminálně uložené, bez přívěsků. Ke sporulaci dochází poměrně snadno v tekutých i ve ztužených médiích. Buněčné stěny obsahují mimo základních komponent meso-DAP (Diaminopimelovou kyselinu) a glukosu. Dále jsou přítomny kyselina glutamová a alanin. Kolonie vytvořené na agaru mají v průměru 1 - 6 mm a jsou různého tvaru. Optimální teplota růstu je 30 - 37°C, mnohé kmeny však dobře rostou i za teploty 25 °C a některé dokonce při 10°C (Rainey et al., 2009).

Zdroje těchto bakterií jsou velice různorodé. Mohou se objevovat v půdě, v mořských i sladkovodních sedimentech. Dále se vyskytují v sýrech, v bachoru zdravých telat, v živočišných i lidských výkalech a jejich přítomnost byla zjištěna také v hadím jedu. *Clostridium butyricum* bylo nalezeno i v krvi, moči, dolních dýchacích cestách, břišní dutině, v ránách a abscesech (Rainey et al., 2009).

Clostridium butyricum produkuje kyselinu máselnou. Tato bakterie zvyšuje koncentrace máselné kyseliny v celé délce tráveniny ptáků (Zhang et al., 2011). Důležitost kyseliny máselné spočívá zvláště ve výživě epitelových buněk a inhibici patogenů ve střevě (Meimandipour et al., 2010). *Clostridium butyricum* je odolné vůči nízkému pH i vysokým teplotám (Kong et al., 2011).



Obr. 3. Nejednoznačné role *Clostridium butyricum* v organismu hostitele. Některé kmeny *Clostridium butyricum* jsou popisovány jako patogenní, projevující se negativními faktory-toxiny; enzymy, například neuraminidázy; adhezivní molekuly; nebo sekrecí vysoké hladiny kyseliny máselné. Naopak některé další kmeny *Clostridium butyricum* jsou brány za prospěšné pro hostitele díky produkci bakteriocinů; inhibici patogenů; a sekreci kyseliny máselné (Cassir et al., 2015).

3.3.4 *Clostridium butyricum* jako probiotikum

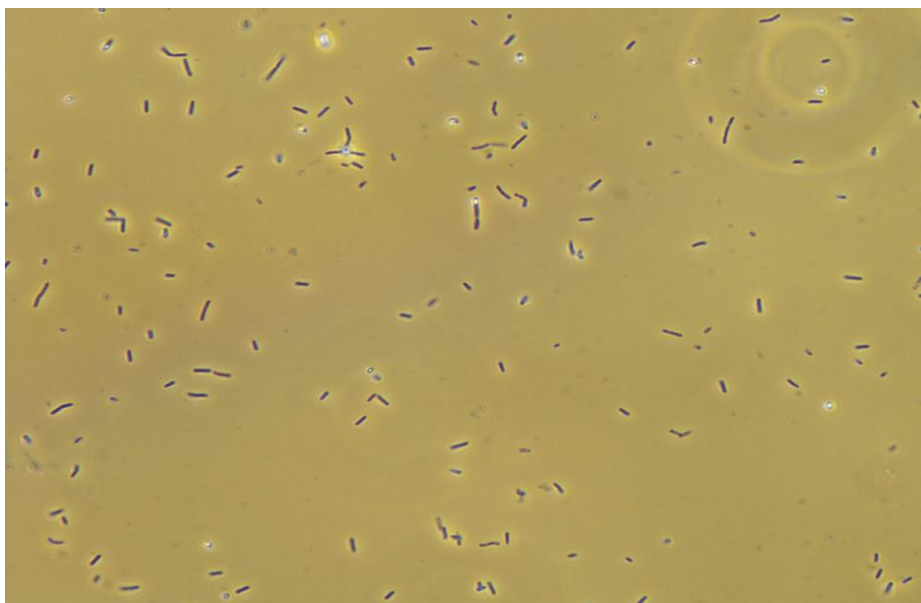
V komerční produkci drůbeže je vývoj střevní mikrobioty kuřat často ovlivněn moderními postupy, jako například hygienou zařízení, podáváním léků a umělou inkubací

vajíček, líhnutí a chovem kuřat. V důsledku toho jsou kuřata více citlivá na kolonizaci bakteriálními patogeny (Barrow, 1992). Ve velkoprodukci drůbeže se antibiotika běžně používají ke snížení výskytu onemocnění. V roce 2001 Evropská unie zakázala používání antibiotik za účelem podpory růstu zvířat, což zvýšilo obavy veřejnosti v otázce bezpečnosti jejich použití (Evropská komise, 2001). Vzhledem k tomu se zvýšila snaha najít nové alternativy. Jedna z těchto alternativ je ovlivnit střevní mikrobiotu užíváním probiotik.

Stále čtenější jsou zprávy o probiotickém potenciálu *Clostridium butyricum* (Zhang et al. 2002; Seki et al, 2003; Araki et al, 2004; Shimbo et al, 2005). Zajímavým příkladem je *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588, který vykazuje probiotické vlastnosti a je doporučován jako přísada do krmiv (Shimbo et al., 2005). Bylo prokázáno, že *Clostridium butyricum* podporuje růst zvířat, vyváženou střevní mikrobiotu, zlepšuje střevní vývoj a stimuluje imunitní systém, což má příznivý vliv na kvalitu masa a celkově na trávicí trakt brojlerových kuřat (Zhang et al., 2011; Meimandipour et al., 2010; Gao et al., 2012; Yang et al., 2012). Při podávání probiotického *Clostridium butyricum* brojlerům po dobu 40 dnů, byly zjištěny také zvýšené hladiny IgA (imunoglobulinu A), IgG (imunoglobulinu G) a IgM (imunoglobulinu M) (Yang et al., 2012)

Clostridium butyricum může produkovat endospory, které hrají klíčovou roli ve schopnosti přežít při nižším pH a relativně vyšší koncentraci žlučových kyselin na rozdíl od bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Kong et al., 2011). Tyto vlastnosti jsou přínosem ve využití *Clostridium butyricum* jako probiotika v krmivech pro zvířata. Předchozí studie prokázaly, že *Clostridium butyricum* podporuje růst bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a omezuje výskyt průjmů v důsledku užívání antibiotik (Seki et al., 2003; Imaze et al., 2008; Kong et al., 2011; Zhang et al., 2011). Bylo také dokázáno, že orální podávání kmene *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 může zvýšit imunitu v dýchacích cestách myši (Murayama et al., 1995).

Významné zlepšení krmiva bylo pozorováno ve čtyřech studiích, kdy byla kuřata krmena Miya-Gold® 5 x 10⁸ CFU kg⁻¹ krmiva. Miya-Gold® je zootechnické aditivum, obsahující 5 x 10⁸ CFU / g životaschopných spor *Clostridium butyricum* jako účinnou látku. Tento přípravek je registrován v Evropské unii pro výkrm kuřat. Jeho použití je také schváleno v mnoha asijských zemích, a to jak pro člověka, tak i pro většinu druhů zvířat. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 je původně izolováno z půdy. Očekávaný účinek Miya-Gold je lepší konverze krmiva, vyšší průměrný denní přírůstek a tím i vyšší finální tělesné hmotnosti kuřat na výkrm (Evropský úřad pro bezpečnost potravin, 2013).



Obr. 4. Izolát z krmiva Miya-Gold, získaný pomocí mikroskopu Nikon eclipse E200 s kamerou Nikon DS-Fi2, zvětšení 15×40 (foto Švejstl). Na fotografii jsou kromě vegetativních buněk vidět i charakteristické spory v podobě světlých útvarů.

Nepříznivý účinek byl pozorován pouze při užití 100násobného překročení doporučené dávky. Proto se FEEDAP (Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed) domnívá, že důkazy o účinnosti Miya-Gold® byly při doporučeném dávkování prokázány. Dále FEEDAP uvádí, že využití Miya-Gold® jako doplňkové látky by nemělo představovat riziko pro spotřebitele, jelikož kmeny *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 nemají toxický potenciál a obavy o bezpečnost při užívání jsou omezeny na případné senzibilizace.

Clostridium butyricum v krmivech nepředstavuje riziko pro životní prostředí, jelikož se jedná o přirozeně se vyskytující půdní mikroorganismus (Evropský úřad pro bezpečnost potravin, 2013).

4 Materiál a metody

Probiotické vlastnosti *Clostridium butyricum* byly testovány *in vivo*. Bylo testováno celkem 160 brojlerů ROSS 308. Brojleři v experimentální skupině byli krmeni krmnou směsí s přídatkem 1 g/1000 g krmiva Miya-Gold od 2. do 49. dne života a samotným krmivem ve skupině kontrolní. Tyto krmné směsi byly peletovány, aby se snížila prašnost. Obě skupiny se skládaly z 80 jedinců.

Ve výživářské části experimentu byla hodnocena průměrná hmotnost, konverze krmiva a průměrný denní přírůstek, a to při 1., 7., 10., 20., 35. a 49. dnu.

V mikrobiologické části studie byly analyzovány celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterie, laktobacily, enterokoky, *Escherichia coli* a koliformní bakterie. Tyto hodnoty byly zkoumány 1., 10. a 42. den ve voleti a slepém střevě pěti náhodně vybraných jedinců. Ihned po porážce byl odebrán 1 gram obsahu volete a 1 gram obsahu slepého střeva. Tyto vzorky byly dány do zkumavek obsahující minimální médium v anaerobním prostředí ze směsi H₂ a CO₂. Analýzy byly provedeny bezprostředně po odběru vzorku:

- anaerobní kultivace pro stanovení celkového počtu bakterií a bifidobakterií
- mikroaerofilní kultivace pro stanovení počtu laktobacilů
- aerobní kultivace pro stanovení počtu enterokoků, *Escherichia coli* a koliformních bakterií

Vyhodnocení bylo provedeno sečtením mikroorganismů po kultivaci při teplotě 37 ° C po dobu 48 hodin (24 hodin pro *E. coli*). Média použitá pro kultivaci jednotlivých skupin bakterií jsou uvedena v tabulce 1.

<i>Skupiny testovaných bakterií</i>	<i>Kultivační média</i>
Celkový počet mikroorganismů	Wilkins-Chalgren anaerobe agar s přidavkem sojového peptonu (W+S)
Bifidobakterie	W+S s přidavkem 200 mg/100 mL mupirocinu a 100 µL/100 mL ledové kyseliny octové (Rada a Petr, 2000)
Laktobacily	Rogosa agar s přidavkem 132 µL/100 mL ledové kyseliny octové
Enterokoky	Slanetz-Bartley agar
<i>Escherichia coli</i>	T.B.X. agar
Koliformní bakterie	T.B.X. agar

Tabulka 2: Média použitá pro kultivaci jednotlivých bakterií.

Wilkins-Chalgren anaerobe agar je složen z následujících látek: trypton (10 g), pepton ze želatiny (10 g), kvasničný extrakt (5 g), glukosa (1 g), NaCl (5 g), L- arginin (1 g), pyruvát sodný (1 g), menadion (0,0005 g), haemin (0,005 g), hodnota pH je 7.1. 43 g je rozpuštěno v 1 litru destilované vodyspolečně s 5 g sojového peptonu, přivedeno k varu, do úplného rozpuštění. Následuje sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Jako

kultivační médium pro bifidobakterie byl použit také Wilkins-Chalgren anaerobe agar, navíc s přidavkem mupirocinu a ledové kyseliny octové podle Rady a Petra (2000).

Ke kultivaci laktobacilů byl použit Rogosa agar, který má následující složení: trypton (10 g), kvasničný extrakt (5 g), glukosa (20 g), sorbitolmono-9-oktadecenoát (1 g), dihydrogenfosforečnan draselný (6 g), citronan amonný (2 g), octan sodný (17 g), sulfát hořečnatý (0,575 g), síran železnatý (0,034 g), agar (20 g); pH bylo po rozvaření upraveno 132 μ L/100 mL ledové kyseliny octové.

Slanetz-Bartley medium bylo použito pro kultivaci enterokoků. Toto médium je složeno z tryptonu (20 g), kvasničného extraktu (5 g), glukosy (2 g), hydrogenfosforečnan dihydrát $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ (4 g), azid sodný (0,4 g), trifenyltetrazolium chlorid (0,1 g), agar (10 g). Hodnota pH je 7,2. 42 g bylo rozpuštěno v destilované vodě a opatrně rozvařeno do zlatavého zbarvení. Po vytemperování na 50 °C bylo nalito na Petriho misky pro použití na plotnovou metodu.

T. B. X. medium (Tryptone Bile Agar with X-Glucuronide) obsahuje trypton (20 g), žlučové soli č. 3 (1, 5 g), agar (15 g), glukoronidáza (0, 075 g). Hodnota pH je 7,2. 36,6 g TBX media bylo rozpuštěno v 1 litru destilované vody a sterilováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po vytemperování na 50 °C bylo nalito na Petriho misky pro použití na plotnovou metodu.

Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem byla provedena s pomocí plynové chromatografie za použití kolony Stabilwax®-DA a vodíku jako nosného plynu.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginie, USA) použitím dvouvýběrových t-testů s rovností rozptylů.

5 Výsledky

Výsledky průměrného denního přírůstku, průměrné hmotnosti a konverze krmiva jsou uvedeny v tabulkách 3, 4 a 5.

<i>Průměrná hmotnost (g)</i>						
	Den 1	Den 7*	Den 10*	Den 20*	Den 35	Den 49*
Experimentální skupina	44.7	138.1	217.3	810.3	1787.2	3231.7
Kontrolní skupina	44.1	131.0	195.0	760.1	1767.9	2780.9

Tabulka 3. Průměrná hmotnost testovaných brojlerů. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*).

<i>Denní přírůstek (g)</i>					
	Den 1- 7	Den 1 -10	Den 11- 20	Den 21- 35	Den 36- 49
Experimentální skupina	15.56	19.17	59.30	65.13	103.17
Kontrolní skupina	14.48	16.77	56.56	67.19	72.36

Tabulka 4. Průměrné denní přírůstky testovaných brojlerů.

<i>Konverze krmiva (kg)</i>							
	Den 1- 7	Den 1 -10	Den 11- 20	Den 21- 35	Den 36- 49	Do 35. dne	Do 49. dne
Experimentální skupina	1.53	1.71	1.70	2.22	2.04	1.79	1.84
Kontrolní skupina	2.09	1.90	1.81	1.82	2.76	1.90	2.08

Tabulka 5. Poměry konverze krmiva testovaných brojlerů.

Výsledky ukazují schopnost Miya-Goldu zvýšit konverzi krmiva, denní přírůstek a tím i hmotnost kuřat na výkrm.

Výsledky mikrobiologické analýzy jsou uvedeny v tabulkách 6, 7, 8, 9, 10 a 11. Počty bakterií byly vyjádřeny v log CFU/g vzorku.

<i>Slepé střevo, den 1.</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
Celkové počty	10.08 ± 0.26	10.06 ± 0.28
Bifidobakterie	4.92 ± 1.27	5.09 ± 1.09
Laktobacily	5.91 ± 0.47	6.87 ± 0.91
Enterokoky	9.55 ± 0.43	8.90 ± 1.75
<i>Escherichia coli</i>	9.60 ± 0.06	9.03 ± 1.70
Koliformní bakterie	8.38 ± 0.06	7.59 ± 1.19

Tabulka 6. Počty bakterií tlustého střeva, 1. den.

<i>Vole, den 1.</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
Celkové počty	8.95 ± 0.31	9.01 ± 0.12
Bifidobakterie	-	5.40 ± 0.46
Lactobacily	5.54 ± 1.72	7.29 ± 0.78
Enterokoky	7.73 ± 0.78	7.84 ± 0.28
<i>Escherichia coli</i>	7.90 ± 0.78	7.96 ± 0.75
Koliformní bakterie	7.71 ± 0.56	7.60 ± 0.30
pH	4.66 ± 0.23	4.58 ± 0.28

Tabulka 7. Počty bakterií volete, 1. den.

<i>Slepé střevo, den 10.</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
Celkové počty	10.09 ± 0.20	10.25 ± 0.32
Bifidobakterie	9.18 ± 0.23	8.83 ± 1.35
Lactobacily	9.04 ± 0.19	8.55 ± 0.56
Enterokoky	8.64 ± 0.35	7.82 ± 0.61
<i>Escherichia coli</i> *	8.47 ± 0.81	7.29 ± 0.61
Koliformní bakterie	7.25 ± 1.05	7.01 ± 0.51
pH*	5.16 ± 0.15	5.70 ± 0.43

Tabulka 8. Počty bakterií slepého střeva v 10. dni. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*).

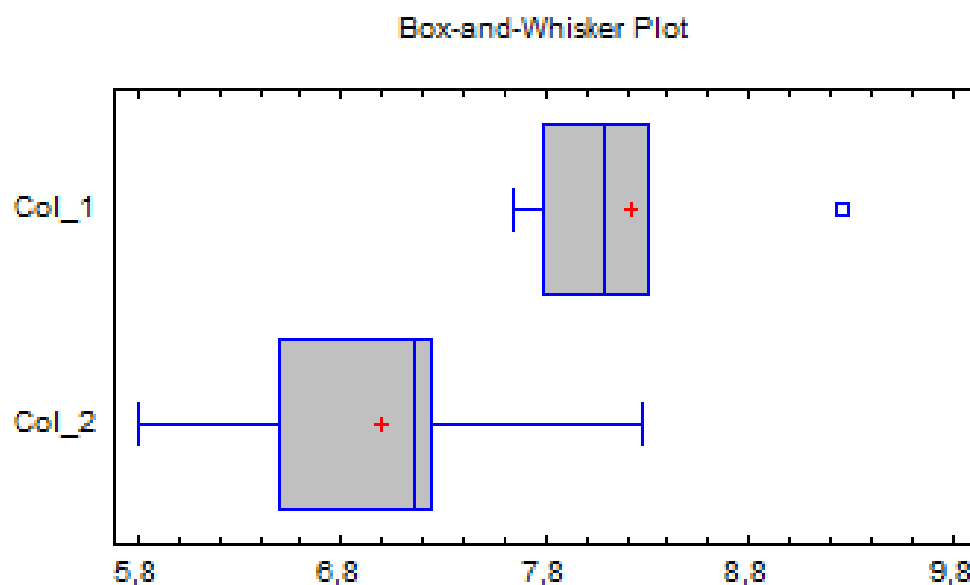
<i>Vole, den 10.</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
Celkové počty	9.32 ± 0.39	9.58 ± 0.46
Bifidobakterie*	5.04 ± 0.39	4.29 ± 0.55
Lactobacily	8.82 ± 0.11	8.69 ± 0.63
Enterokoky	8.08 ± 0.33	8.34 ± 0.63
<i>Escherichia coli</i>	-	-
Koliformní bakterie	6.70 ± 0.55	6.40 ± 0.35
pH	4.72 ± 0.11	4.42 ± 0.22

Tabulka 9. Počty bakterií volete v den 10. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*).

<i>Slepé střevo, den 42.</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
Celkové počty	10.09 ± 0.26	10.13 ± 0.23
Bifidobakterie	9.92 ± 0.36	9.55 ± 0.19
Lactobacily	8.53 ± 0.31	9.01 ± 0.40
Enterokoky*	8.10 ± 0.17	7.55 ± 0.39
<i>Escherichia coli</i>*	8.22 ± 0.64	7.00 ± 0.92
Koliformní bakterie	7.06 ± 0.60	6.05 ± 1.10
pH	6.44 ± 0.09	6.04 ± 0.51

Tabulka 10. Počty bakterií slepého střeva v den 42. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*).

Graf 1. zobrazuje porovnání *E. coli* u obou skupin ze slepého střeva ze dne 42. pomocí krabicového diagramu.



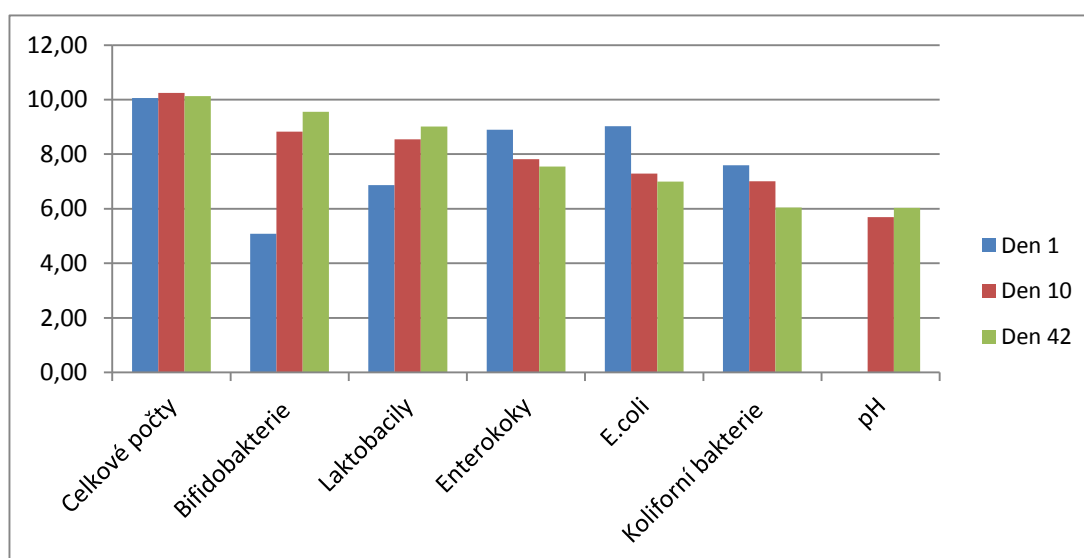
Graf 1. Krabicový diagram slepého střeva, *E. coli*, den 42. Nahoře kontrolní a dole pokusná skupina. Za pomoci dvouvýběrového t-testu byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($P < 0,05$).

<i>Vole, den 42.</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
Celkové počty	8.74 ± 0.56	9.65 ± 0.33
Bifidobakterie	5.20 ± 0.32	4.73 ± 0.96
Lactobacily	8.29 ± 0.59	9.04 ± 0.44
Enterokoky	7.18 ± 0.43	6.94 ± 0.40
<i>Escherichia coli</i>*	6.73 ± 0.52	5.64 ± 0.47
Koliformní bakterie*	6.05 ± 0.75	4.33 ± 0.35
pH*	5.74 ± 0.53	4.72 ± 0.35

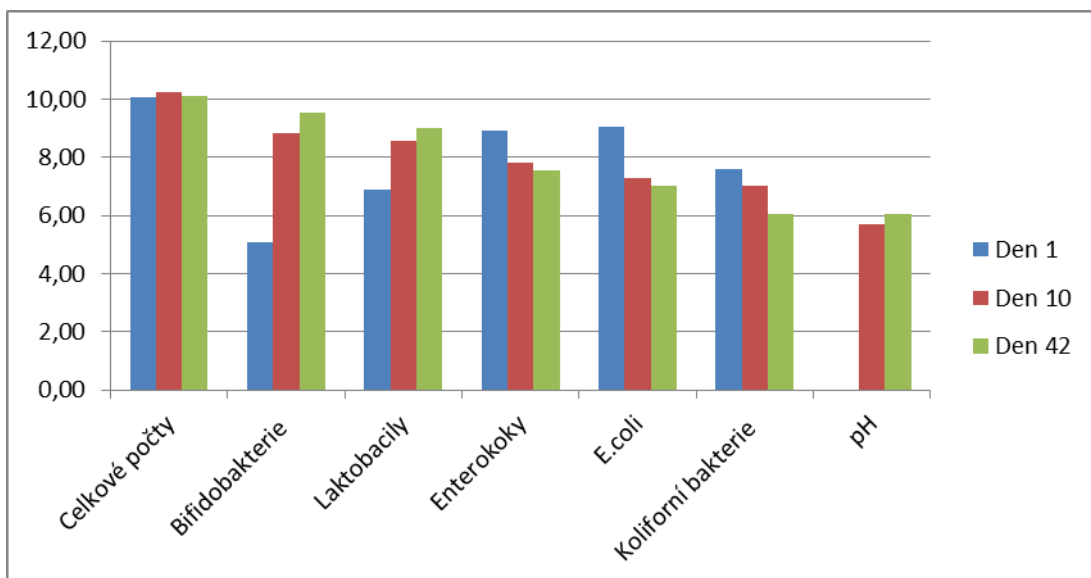
Tabulka 11. Počty bakterií volete v den 42. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*).

Podle analýzy mikrobioty ve 42. dnu jsme shledali statisticky významně nižší ($P > 0,05$) počty *Escherichia coli* ve slepém střevě a rovněž nižší množství *Escherichia coli* a koliformních bakterií ve voleti. Analýza také prokázala nižší pH ve voleti v Miya-Gold skupině.

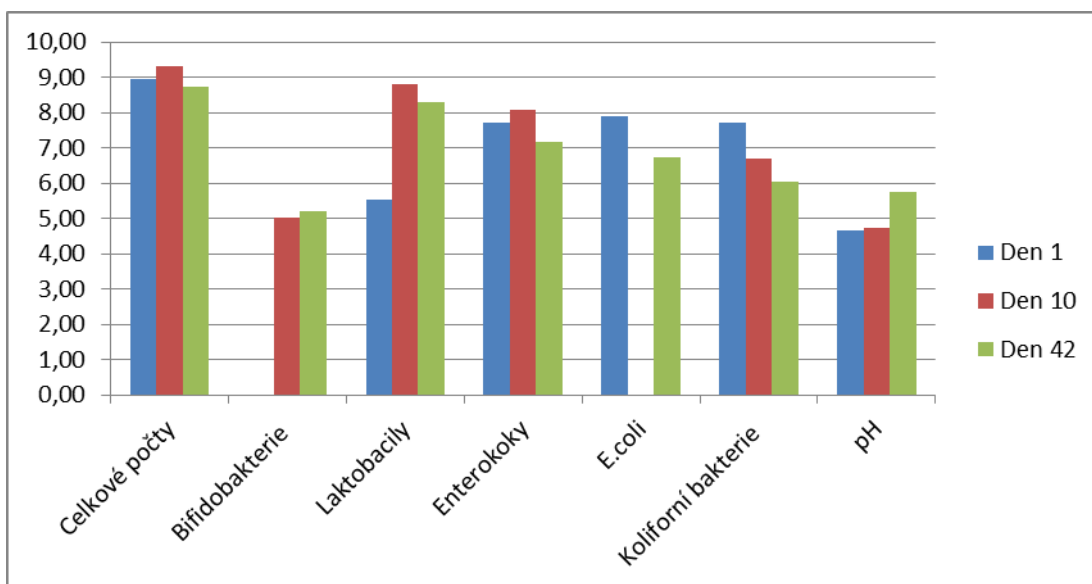
V následujících grafech jsou znázorněny změny v počtech bakterií a hodnoty pH s přibývajícím věkem.



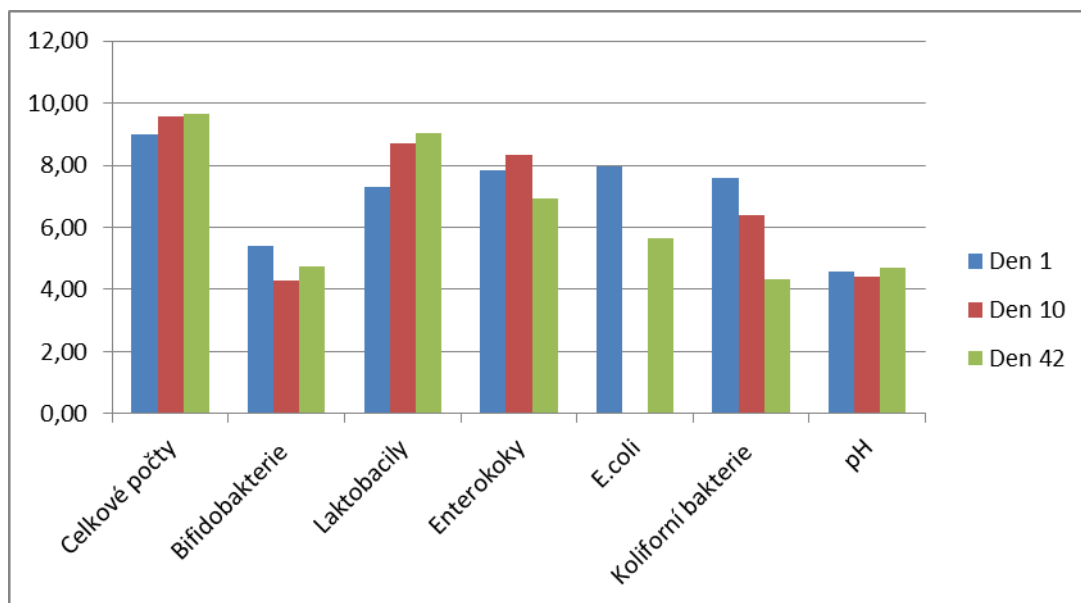
Graf 1. Počty bakterií a hodnota pH ve slepém střevě u kontrolní skupiny v den 1, 10 a 42.



Graf 2. Počty bakterií a hodnota pH ve slepém střevě u pokusné skupiny v den 1, 10 a 42.



Graf 3. . Počty bakterií a hodnota pH ve voleti u kontrolní skupiny v den 1, 10 a 42.



Graf 4. Počty bakterií a hodnota pH ve voletu u pokusné skupiny v den 1, 10 a 42.

V tabulkách 12. a 13. jsou uvedena naměřená množství těkavých mastných kyselin s krátkým řetězcem ve vzorcích ke dni 42.

<i>Metabolit</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
acetát	441.52	381.08
propionát	183.42	196.96
isobutyryát	3.37	2.14
butyrát*	103.41	132.12
isovalerát	7.51	4.08
valerát	8.24	4.80
isokapronát*	0.91	2.74
kapronát	1.18	0.28
heptanoát	ND	ND
Σ	749.57	724.19

Tabulka 12. Množství mastných kyselin s krátkým řetězcem ve slepém střevě ke 42. dni. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) jsou označeny hvězdičkou (*).

Bylo zjištěno statisticky významně vyšší ($P < 0,05$) množství kyseliny máselné ve slepém střevě u Miya-Gold skupiny. Množství ostatních mastných kyselin s krátkým řetězcem se statisticky významně nelišily.

<i>Metabolit</i>	<i>Kontrola</i>	<i>Miya-Gold</i>
acetát	59.42	58.79
propionát	1.14	0.27
isobutyřát	2.19	1.85
butyřát	-	-
isovalerát	0.48	-
valerát	2.46	1.25
isokapronát	4.64	3.70
kapronát	0.84	2.78
heptanoát	-	-
Σ	71.16	68.63

Tabulka 13. Množství mastných kyselin s krátkým řetězcem ve voleti ke 42. dni.

6 Diskuze

Zjistili jsme, že průměrná hmotnost jedinců ve skupině s přidavkem Miya- Gold, byla statisticky významně vyšší ($P < 0,05$), než v kontrolní skupině v den 7, 10, 20 a 49. Bylo prokázáno, že testované *Clostridium butyricum* podporuje růst brojlerů, což je v souladu s poznatky z jiných studií (Zhang et al., 2011; Meimandipour et al., 2010; Gao et al., 2012; Yang et al., 2012) a zároveň zvyšuje stabilitu střevní mikrobioty, což má příznivý vliv na zdraví a užitkovost zvířat.

Z vyšších denních přírůstků tělesné hmotnosti a tím pádem i ze statisticky významně vyšší průměrné tělesné hmotnosti vyplývá také lepší konverze krmiva.

Jedinou výjimkou je průměrná hmotnost v 35. dnu, která má zásadní vliv na výkrm kuřat. V této době jsme mezi skupinami nezjistili žádné významné rozdíly v průměrné hmotnosti. Denní přírůstek v této době naopak statisticky nevýznamně klesnul a konverze krmiva se také zhoršila. Tyto výjimky mohou být důsledkem hierarchickým chováním, které se může objevit v určitém životním období kuřat (Estevez et al., 2003). Důsledkem toho je skupina méně homogenní a výsledky mohou být více variabilní.

Co se týče počtu jednotlivých bakterií a hodnot pH, nebyly mezi kontrolní a pokusnou skupinou k 1. dni pozorovány žádné staticky významné rozdíly. První staticky významné rozdíly se projeví v den 10, a to v případě počtu *Escherichia coli* ve slepém střevě a počtu bifidobakterií ve voleti. V 10. dni jsme mohli pozorovat také statisticky významně vyšší pH ve slepém střevě u experimentální skupiny. V den 42 se objevilo již více statisticky

významných rozdílů. Ve slepém střevě došlo ke statisticky významnému snížení počtu enterokoků a *Escherichia coli* u pokusné skupiny. Ve voleti se u experimentální skupiny projevily statisticky významné rozdíly v počtu bakterií *Escherichia coli* a koliformních bakterií. U pokusné skupiny dále došlo ve voleti ke statisticky významnému snížení hodnoty pH.

Statisticky významně nižší přítomnost *Escherichia coli* a koliformních bakterií ve slepém střevě i ve voleti u pokusné skupiny podporuje tvrzení Van Immerseel et al. (2004), kteří píší, že produkce kyseliny máselné může hrát klíčovou roli v inhibici patogenních organismů, kam za určitých podmínek patří i některé kmeny *Escherichia coli* a koliformních bakterií. Vzhledem k tomu, že *Clostridium butyricum* produkuje kyselinu máselnou, jako primární metabolit, tak tyto výsledky jasně dokazují schopnost Miya-Goldu ovlivnit složení mikrobioty slepého střeva a volete.

Z výzkumu množství těkavých mastných kyselin s krátkým řetězcem vyplývá, že ke statisticky významnému zvýšení došlo u množství butyrátu a isokapronátu ve slepém střevě. U volete k žádným statisticky významným změnám v množství mastných kyselin s krátkým řetězcem nedošlo. Ze statisticky významně vyššího množství butyrátu ve střevě ve dni 42 vyplývá metabolická aktivita dodaného *Clostridium butyricum*. Jak píše Meimandipour et al. (2010), butyrát vyživuje buňky střevního epitelu a snižuje výskyt patogenů. Butyrát je také zdrojem energie pro zvířata a působí na proliferaci střevních buněk (Topping a Clifton, 2001). Tyto skutečnosti podporuje tvrzení o probiotických vlastnostech *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588.

Zároveň bylo ve střevě ke dni 42 zjištěno statisticky nevýznamně nižší množství acetátu u pokusné skupiny. Vzhledem ke skutečnosti, že statisticky nevýznamně nižší byly i počty bifidobakterií ke dni 42 v pokusné skupině, naznačují tyto skutečnosti, že dodané *Clostridium butyricum* snižovalo výskyt a tím i metabolickou aktivitu bifidobakterií. Statisticky významně nižší počty bifidobakterií se objevily pouze v den 10. Několik studií naopak uvádí, že *Clostridium butyricum* podporuje růst bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Kamiya et al., 1997; Seki et al., 2003; Kong et al., 2011; Zhang et al., 2011). Bifidobakterie mají schopnost omezovat počty patogenních klostridií. Z našich výsledků usuzujeme možnost i opačného efektu projevujícího se sníženým počtem bifidobakterií při dodání *Clostridium butyricum*. Tyto souvislosti jsou vysvětleny negativní korelací bifidobakterií a klostridií (Wang a Gibson, 1993; Gibson a Wang, 1994).

Ke dni 42 jsme také pozorovali statisticky významné snížení počtu enterokoků, což také mohlo být ovlivněno dodaným *Clostridium butyricum*.

Vzorky pokusné skupiny ze dne 42 ze slepého střeva statisticky nevýznamně a z volete statisticky významně vykazují nižší hodnoty pH. Vzhledem k tomu, že suma mastných kyselin s krátkým řetězcem byla u pokusné skupiny ve střevě nižší, než u skupiny kontrolní, příkládám tuto skutečnost snížení počtu potenciálně proteolytických bakterií, jako jsou *Escherichia coli* a koliformní bakterie. Proteolytická aktivita bakterií ve střevě vede ke zvýšení pH, což je ve střevě pokládáno za nežádoucí proces. I z tohoto hlediska lze na testované *Clostridium butyricum* pohlížet, jako na potenciálně probiotický mikroorganismus.

7 Závěr

Hypotéza zněla, že jedinci krmení Miya-Gold budou mít vyšší užitkovost a stabilizuje se jejich střevní mikrobiota. Výsledky jasně ukazují schopnost Miya-Gold ovlivnit složení mikrobioty, jak ve slepém střevě, tak i ve voleti. Výroba kyseliny máselné může hrát klíčovou roli v inhibici patogenních organismů, kam mohou za určitých podmínek patřit některé kmeny *Escherichia coli* a koliformních bakterií.

Výsledky této práce naznačují, že *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 disponuje potenciálně probiotickými vlastnostmi a zlepšuje užitkovost brojlerů. Vzhledem k dodávané formě (spory) může tento kmen v budoucnu najít široké využití ve výživě hospodářských zvířat a třeba jednou i ve výživě lidské.

8 Seznam použité literatury

Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M. A., Tagaki, A., & Koga, Y. 1998. Lactic acid mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *American Journal of Gastroenterology*. 93. 2097–2101.

Ait-Belgnaoui, A., Durand H., Cartier C. 2012. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 37. 11. 1885–1895.

Ali, S., Moore, G., Wilson, A. P. 2011. Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants. *J Hosp Infect* 79. 97–98.

Araki, Y., Andoh, A., Takizawa, J., Takizawa, W., Fujiyama, Y. 2004. *Clostridium butyricum*, a probiotic derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Int J Mol Med*. 13. 577–580.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473. 174–180.

Aston-Jones, G., Ennis M., Pieribone V. A., Nickell W. T., Shipley, M. T. 1986. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science*. 234. 4777. 734–737.

Baba, E., Nagaishi S, Fukata T, Arakawa A. 1991. The role of intestinal microflora on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens. *Poultry Sci*. 70. 1902–07.

Taguchi, H., Takahashi M, Yamaguchi H. 1997. Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J Med Microbiol*. 51. 336–43.

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307. 1915–1920.

Bahl, H., Dürre, P. 2001. Clostridia Biotechnology and Medical Applications. WV Press; Weinheim.

Barra-Carrasco, J., Olguin-Araneda, V., Plaza-Garrido, A., Miranda-Cardenas, C., Cofre-Araneda, G., Pizarro-Guajardo, M., Sarker, M. R., Paredes-Sabja, D. 2013. The Clostridium difficile exosporium cysteine (CdeC)-rich protein is required for exosporium morphogenesis and coat assembly. J Bacteriol. 195. 3863–3875.

Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T., Zagorski, M. G. 1992. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. J Mol Biol. 225(4). 1075-93.

Bartlett, J. G., Goldman, L., Bennett J. C. 2000. Tetanus. In: Cecil's Textbook of medicine. 21st ed. WB Saunders Co., Philadelphia, USA. 1675-1676.

Beckers, L., Hiligsmann, S., Hamilton, Ch., Masset, J., Thonart, P. 2010. Fermentative hydrogen production by Clostridium butyricum CWBI1009 and Citrobacter freundii CWBI952 in pure and mixed cultures. Biotechnol Agron Soc Environ. 14. 541-548.

Bennett, C.F., Condon T.P., Grimm S., CHan H., Chiang M.Y. 1994. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. J. Immunol. 152. 3530–3540.

Berner, L. A., O'Donnell, J. A. 1998. Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. Int. Dairy J. 8. 355–362.

Bernet-Camard, M. F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L., Hudault, S. 1997. The human Lactobacillus acidophilus strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. Applied Environmental Microbiology. 63. 2747–2753.

Bezirtzoglou, E. 1997. The intestinal microflora during the first weeks of Life. Anaerobe. 3. 173-177.

- Bianchi Salvadori, B. 1998. Considerazioni generali sulla sicurezza dei batteri lattici. In: De Simone, C., Famularo, G., Bianchi Salvadori, B., Vesely, R. (Eds.), *Prospettive Terapeutiche dei Batteri Lattici. Teoria ed Applicazioni del Dismicrobismo Intestinale*. Piccin, Perugia, Italy. 31–39.
- Bleck, T.P., Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. 2000. Tetanus. In: Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, USA. 2537-2543.
- Brain, S. D. 1997. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology*. 37. 2-3, 133–152.
- Britton, A., Young, V. B. 2014. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*. 146. 1547–1553.
- Brook, I. 1999. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol*. 25. 155–72.
- Buriti, F. C. A., Castro, I. A., & Saad, S. M. I. 2010. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 137. 121–129.
- Cassir, N., De La Rosa, S., Melot, A., Touta, A., Troude L., Loundou A., Richet H., Roche, P. H. 2015. Risk factors for surgical site infections after neurosurgery: A focus on the postoperative period. *American Journal of Infection Control*. 43(12). 1288-1291.
- Colin, T., Bories, A., Moulin. G. 2000. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 54. 201-205.
- Cook S. I., Sellin J. H.. 1998. Review article; short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 12. 499-507.
- Cryan, J. F., Dinan T. G. 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour,” *Nature Reviews Neuroscience*. 13. 10. 701–712

- Cummings, J. H., Pomare E. W., Branch W. J., Naylor C.P., Macfarlane G. T. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 28(10):1221-1227.
- Dabek, M., McCrae S. I., Stevens V. J., Duncan S. H., Louis P. 2008. Distribution of Î²-glucosidase and Î²-glucuronidase activity and of Î²-glucuronidase gene gus in human colonic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 66(3). 487-495.
- Dai, D., Walker, W.A., 1999. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Advances in Pediatrics* 46. 353–382.
- Deakin, L. J., Clare, S., Fagan, R. P., Dawson, L. F., Pickard, D. J., West, M. R., Wren, B. W., Fairweather, N. F., Dougan, G., Lawley, T. D. 2012. The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infect Immun*. 80. 2704–2711.
- Demain, A. L., Newcomb, M., Wu, J. H. D. 2005. Cellulase, Clostridia and ethanol. *Microbiol Mol Biol*. 69. 124-154.
- DiBaise, J. K., Zhang, H., Crowell, M. D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G. A., Rittmann, B. E. 2008. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* 83. 460–469.
- Duchesnes, C. 2006. Clostridia in medical, veterinary and food microbiology: Diagnosis and typing. Luxembourg: European Communities. ISBN 92-79-00422
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308. 1635–1638.
- Estevez, I., Keeling, L. J., Newberry, R.C. 2003. Decreasing aggression with increasing group size in young domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science*. 84(3). 213-218.
- European Food Safety Authority. 2013. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Miya-Gold (*Clostridium butyricum*) for chickens for fattening, chickens reared for laying and minor

avian species¹ EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. 9(1). 1951.

Favier, C. F., Vaughan, E. E., de Vos, W. M., Akkermans, A. D. L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68. 219–226.

Flint, H. J., Bayer E. A., Rincon M. T., Lamed R., White B. A. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol*.6. 121–131.

Fukiya, S., Arata M., Kawashima H. 2009. Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiology Letters*. 293(2). 263-270.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 66. 365–78.

Gao, Q. X., Qi, L. L., Wu, T. X., Wang, J. B. 2012. *Clostridium butyricum* activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells. *Mol Cell Biochem*. 361(1-2). 31–37.

Gasser, F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin de l'Institut Pasteur Y* 91. 45–67.

Gehring, U., Bischof W., Fahlbusch B., Wichmann H. E, Heinrich J. 2002. House dust endotoxin and allergic sensitization in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 166. 939–44.

Gibson, G. R., Wang X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol*. 77(4). 412-20.

Gill, H. S., Darragh, A. J., Cross, M. L., 2001. Optimizing immunity and gut function in the elderly. *J. Nutr. Health Aging* 5 (2). 80–91.

- Guarner, F., Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361. 512–519.
- Hammes, W. P., Tichaczek, P. S. 1994. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z Lebensm Unters Forsch.* 198. 193–201.
- Hammilton-Miller, J. M. T. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *H. pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 22. 360–366.
- Hao, J., Lin, R., Zheng, Z., Liu, H., Liu, D. 2008. Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. *World J Microbiol Biotechnol.* 9. 1731-1740.
- Haukioja, A. 2010. Probiotics and Oral Health. *Eur J Dent.* 4. 348-55.
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., Benno, Y. 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and rectosigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* 54. 11. 1093–1101.
- He, T., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Welling, G. W. 2003. Composition of faecal microbiota of elderly people. *Microb. Ecol. Health Dis.* 15 (4). 153–159.
- Henker, J., Laass, M., Blokhin, B. M., Bolbot, Y. K., Maydannik, V. G., Elze, M., Wolff, C., Schulze, J. 2007. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr.* 166. 311–318.
- Hill, C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., et al. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11 506–514.
- Hooper, L. V., Gordon, J. I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292, 1115-1118.

- Hopkins, M. J., Sharp, R., Macfarlane, G. T. 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture. 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 48. 198–205.
- Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M. F., Servin, A. L. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. 513–518.
- Champagne, C., Gardner, N., Roy, D., 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45. 61–84.
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., Charalampopoulos, D. 2011. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*. 149. 185–193.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S.S., Webb, C., 2002. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 79, 131–141.
- Janoir, C., Deneve, C., Bouttier, S., Barbut, F., Hoys, S., Caleechum, L., Chapeton-Montes, D., Pereira, F. C., Henriques, A. O., Collignon, A., Monot, M., Dupuy, B. 2013. Adaptive strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from in vivo transcriptomics. *Infect Immun*. 81. 3757–3769.
- Joint FAO/WHO. 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada.
- Kaur, G., Srivastava, A. K., Chand, S. 2012. Simple strategy of repeated batch cultivation for enhanced production of 1,3-Propanediol using *Clostridium diolis*. *Appl Biochem Biotechnol*. 167. 1061–1068.
- Kelly, C. P., LaMont, J. T. 2008. *Clostridium difficile*—more difficult than ever. *N Engl J Med*. 359. 1932–1940.

- Khurana, H. K., Kanawjia, S. K. 2007. Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition and Food Science*. 3. 91–108.
- Kong, Q., He, G. Q., Jia, J. L., Zhu, Q. L., Ruan H. 2011. Oral administration of *Clostridium butyricum* for modulating gastrointestinal microflora in mice. *Curr Microbiol*. 62(2). 512–517.
- Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G., Stolte, M. 1997. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 11. 853– 858.
- Kubiak, P., Leja, K., Myszka, K., Celinska, E., Sychala, M., Szymanowska-Powalowska, D., Czaczyk, K., Grajek, W. 2012. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Process Biochem*. 47. 308-1319.
- Lawley, T. D., Clare, S., Deakin, L. J., Goulding, D., Yen, J. L., Raisen, C., Brandt, C., Lovell, J., Cooke, F., Clark, T. G., Dougan, G. 2010. Use of purified *Clostridium difficile* spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. *Appl Environ Microbiol*. 76. 6895–6900.
- Lee, J. H., O'Sullivan, D. J., 2010. Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74. 378–416.
- Leja, K., Myszka, K., Kubiak, P., Wojciechowska, J., Olejnik-Schmidt, A. K., Czaczyk, K., Grajek, W. 2011. Isolation and identification of *Clostridium* spp. from natural samples that performs effective conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *Acta Sci Pol Biotechnol*. 10. 25-34.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., Gordon, J. I. 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444. 1022–1023.
- Lievin, V., Peiffer I., Hudault S. 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. 47. 646–52.

- Lilly, D. M., Stillwell, R. H. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147. 747–8.
- Macdonald, T. T., Monteleone, G. 2005 Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307. 1920–1925.
- Mackie, R. I., Sghir, A., Gaskins, H. R. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 69. 1035–1045.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12. 173–182.
- Maragkoudakis P. A., Zoumpopoulou G., Miarisa Ch., Kalantzopoulou G., Potb B., Tsakalidou F. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products; *International Dairy Journal* 16. 189–199.
- Marques, T. M., Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Ryan, C. A., Stanton, C. 2010. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Current Opinion in Biotechnology* 21. 149–156.
- Beckers, L., Hilgsmann, S., Hamilton, Ch., Masset, J., Thonart, P. 2010. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 14. 541-548.
- Metsoviti, M., Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., Galiotou-Panayotou, M., Nychas, G. J. E., Zeng, A. P., Papanikolaou, S. 2012. Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Eng Life Sci.* 1. 57–68.
- Mitsuoka, T. 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 50. 438- 446.

- Murayama, T., Mita, N., Tanaka, M., Kijato, T., Asano T., Mizuochi K., Kaneko, K. 1995. Effects of orally administered *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 on mucosal immunity in mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 48(3-4). 333-342.
- Nouaille, S., Ribeiro, L. A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P., Azevedo V. 2003. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2. 102–111.
- Oh, S. E., Zuo, Y., Zhang, H., Guiltinan, M. J., Logan, B. E., Regan, J. M. 2009. Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. *Int J Hyd Energy*. 34. 9347-9353.
- Ouwehand, A., Isolauri, E., Salminen, S., 2002. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *European Journal of Nutrition* 41.
- Palmer, C., Bik, E. M., Digiulio, D. B., Relman, D. A., Brown, P. O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5. 177.
- Pandey, V., Berwal, V., Solanki, N., Malik, N. S. 2015. Probiotics: Healthy bugs and nourishing elements of diet. *J Int Prevent Communit Dent*. 5. 81- 7.
- Paredes-Sabja, D., Cofre-Araneda, G., Brito-Silva, C., Pizarro-Guajardo, M., Sarker, M. R. 2012. *Clostridium difficile* spore-macrophage interactions: spore survival. *PLoS One* 7. 43635.
- Peck, M. W., Duchesnes, C., Mainil, J., Granum P. E. 2004. *Clostridium botulinum* and foodborne botulism. In: *Food microbiology and sporulation of the genus Clostridium*. Proceedings of the meeting of the CA QLK2-CT2001-01267. Presses Fac. Méd. Vét. ULg, Liège, Belgium. 27- 37.
- Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., Malcata, F. X. 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic

acid bacteria— With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*. 26. 31– 42.

Permpoonpattana, P., Phetcharaburanin, J., Mikelson, A., Dembek, M., Tan, S., Brisson, M. C., La Ragione, R., Brisson, A. R., Fairweather, N., Hong, H. A., Cutting, S. M. 2013. Functional characterization of *Clostridium difficile* spore coat proteins. *J Bacteriol*. 195. 1492–1503.

Rada, V., Petr, J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*,. 43(2). 127- 132.

Rainey, F. A., Hollen, B. J., Small, A. 2009. Genus *Clostridium* Whitman (Ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, London. 513-532.

Rakoff-Nahoum, S. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. 118. 229– 241.

Ridlon, J. M. 2005. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *The Journal of Lipid Research*. 47(2). 241-259.

Ren, Z., Ward, T. E., Logan, B. E., Regan, J. M. 2007. Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species. *J Appl Microbiol*. 103. 2258-2266.

Rupnik, M., Wilcox, M. H., Gerding, D. N. 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Micro*. 7. 526–536.

Sanders, M. E., Veld, J. H. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product regulatory and labelling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76. 293–315.

Sapp, J. 2005. The bacterium place in nature. *Microbial phylogeny and evolution. Concepts and controversies*. Oxford university press. 317

- Sartor, R. B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 134. 577–594.
- Seki, H., Shiohara, M., Matsumura, T., Miyagawa, N., Tanaka, M., Komiyama, A., Kurata, S. 2003. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatr Int*. 45. 86–90.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P. A., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., & Mentis, A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*. 70. 518–526.
- Shimbo, I., Yamaguchi, T., Odaka, T., Nakajima, K., Koide, A., Koyama, H., Saisho, H. 2005. Effect of *Clostridium butyricum* on fecal flora in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol*. 11. 7520–7524.
- Schlegel, H. G. 1993. *General Microbiology*. CU Press. Cambridge.
- Schutz, E. 1989. The treatment of intestinal diseases with Mutaflor. A multicenter retrospective study. *Fortschr Med*. 107. 599–602.
- Silverman, M. N., Sternberg E. M. 2012. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1261. 1. 55–63.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., Thaker, V. 2011. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1. 287– 290.
- Sjögren, Y. M., Jenmalm M. C., Böttcher M. F., Björkstén B., Sverremark-Ekström E. 2009. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical & Experimental Allergy*. 39(4). 518-526.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D. 2010. The potential of probiotics. *Food Technology Biotechnology*,

48. 413–434.

Song, J. H., Ventura, J. R. S., Lee, Ch. H., Jahng, D. 2011. Butyric acid production from brown algae using *Clostridium butyricum* ATCC 25755. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 16. 42-49.

Sternberg, E. M. 2001. Neuroendocrine regulation of autoimmune/ inflammatory disease,” *Journal of Endocrinology.* 169. 3. 429–435, 2001.

Sudo, N., Chida Y., Aiba Y. 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice,” *Journal of Physiology.* 558. 1. 263–275.

Surawicz, C. M., McFarland, L. V. 1999. Pseudomembranous colitis: causes and cures. *Digestion.* 60. 91–100.

Suvarna, V. C., Boby, V. U. 2005. Probiotics in human health: A current assessment. *Cur Sci.* 88. 1744-8.

Ting, P. T., Freiman, A. 2004. The story of *Clostridium botulinum*: from food poisoning to botox. *Clin Med. Res* 4. 258-261.

Topping, D. L., Clifton, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 81(3). 1031-64.

Tse, K, Horner A. A. 2008. Allergen tolerance versus the allergic march: the hygiene hypothesis revisited. *Curr Allergy Asthma Rep.* 8. 475–83.

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457. 480–484.

Van Immerseel, F., De Buck, J., De Smet, I., Pasmans, F., Haesenbrouck, F., Ducatelle, R. 2004. Interactions of Butyric Acid– and Acetic Acid–Treated *Salmonella* with Chicken Primary Cecal Epithelial Cells In Vitro. *Avian Diseases.* 48(2). 384- 391.

- Vinderola, C.vG., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83. 1905–1911.
- Vyas, U., Ranganathan N. 2012. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract.* 872716.
- Wang, H. K., Li, A. D., Liu, F. F., Qi, W. 2011. Determination of an economical medium for growth of *Clostridium butyricum* TK2 using orthogonal test. *Afr J Microbiol Res.* 5. 1773–1777.
- Wang, X., Gibson G. R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol.* 75(4). 373-80.
- Westendorf, A. M., Gunzer, F., Deppenmeier, S., Tapadar, D., Hunger, J. K., Schmidt, M. A., Buer, J., Bruder, D. 2005. Intestinal immunity of *Escherichia coli* NISSLE 1917: A safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiology.* 43. 373–384.
- Wilkens, E., Ringel, A. K., Hortig, D., Willke, T., Vorlop, K. D. 2011. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Appl Microbiol Biotechnol.* 5. 232–230.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R. 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334. 105–108.
- Yang, C. M., Cao, G. T., Ferket, P. R., Liu, T. T., Zhou, L., Zhang, L. 2012. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poult Sci.* 91(9). 2121–2129.
- Zhang, B. K, Yang, X., Guo, Y. M., Long, F. Y. 2011. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on the performance and the digestive tract of broiler chickens. *Arch Anim Nutr.* 65(4). 329–339.

Zhang, C. H., Ma, Y. J., Yang, F. X., Liu, W., Zhang, Y. D. 2009. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Bioresour Technol.* 100:134–139.

Zhang, S. B., Cui, Y. L., Wu, S. E., Li, D., Wan, F. C 2002. Inhibitory effect of *Clostridium butyricum* (CB) on bacteria. *Zhongguo Xingyao Zazhi.* 11. 322–324.

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., Akkermans-van Vliet, W.M., de Visser, A. J. G. M., de Vos, W. M. 2001 The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis* 13. 129–134.

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., De Vos, W. M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64. 3854–3859.