

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Vliv společného ustájení telete s matkou na kolonizaci  
trávicího traktu telat bifidobakteriemi**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Tereza Nohejlová**

**Obor studia: Živočišná produkce**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Tereza Kodešová**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv společného ustájení telete s matkou na kolonizaci trávicího traktu telat bifidobakteriemi" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za vedení a odborný dohled při psaní této práce a rodině za podporu v průběhu celého studia.

# Vliv společného ustájení telete s matkou na kolonizaci trávicího traktu telat bifidobakteriemi

## Souhrn

Bifidobakterie tvoří důležitou součást střevní mikrobioty. Patří mezi probiotické bakterie a udržují stálé střevní prostředí, stimulují imunitní odpověď, syntetizují vitamíny a zvyšují ochranu před infekčními chorobami. Mikrobiota trávicího traktu se v průběhu života mění a kolonizace střeva je započata možná již v prenatálním období. Po narození je osídlování trávicího traktu bakteriemi závislé na mnoha faktorech, mezi něž patří výživa, způsob porodu, věk matky, délka porodu aj.

Cílem této diplomové práce bylo provést experiment vedoucí ke zjištění vlivu ustájení na kolonizaci trávicího traktu novorozeného telete. Byly vytvořeny 2 skupiny březích dojníc, oběma bylo před porodem podáváno mléko obsahující rifampicin rezistentní kmen bifidobakterií (RRBIF) a po otelení odebrány vzorky stolice, slin, zubního plaku, mléka, plodové vody a vaginálního sekretu. Jedné skupině dojníc bylo tele ihned po porodu odebráno a nedošlo mezi nimi k žádné interakci. Druhé skupině bylo tele ponecháno a byli spolu ustájeni po dobu 24h. Telatům z obou skupin byly poté odebrány vzorky slin a stolice. Kultivační deskovou metodou byly stanoveny celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterií, laktobacilů, *E. coli*, koliformních bakterií a podaného kmene bifidobakterií (RRBIF).

Sledovaný kmen RRBIF byl nalezen ve všech vzorcích stolice, slinách a zubním plaku i plodové vodě a vaginálním sekretu. Koncentraci dodaných RRBIF i celkových bifidobakterií měly ve všech případech vyšší zvířata ze společně ustájené skupiny. Telata z této skupiny měla na začátku experimentu i vyšší množství koliformních bakterií a *E. coli* ve slinách i výkalech, ale později došlo k rozvoji probiotické mikrobioty a následnému potlačení koliformů. Bifidobakterie byly detekovány i ve vzorcích mléka a telata, jež sála mateřské mléko byla bifidobakteriemi kolonizována více. Můžeme proto i mléko považovat za zdroj bifidobakteriálního osídlení. Z výsledků provedeného experimentu můžeme potvrdit, že společné ustájení mláďete s matkou má vliv na kolonizaci trávicího traktu bifidobakteriemi.

**Klíčová slova:** Bifidobakterie; telata; mléko; kolonizace; střevní mikrobiota.

# Effect of housing system on colonization of gastrointestinal tract of calves by bifidobacteria

## Summary

Bifidobacteria are members of the intestinal microbiota of mammals and other animals, and some strains are able to exert health-promoting effects. They are among the first microbial colonizers of the intestines of newborns and play key roles in the development of their physiology, including maturation of the immune system and use of dietary components. The early microbiota is strongly influenced by environmental factors such as the delivery mode and type of nutrition.

The aim of this thesis was to determine the effect of housing system on colonization of gastrointestinal tract of calves by bifidobacteria. There were two experimental groups. In the first one, mothers were housed together with newborn calves for 24 hours after delivery. In the second group, calves were separated from the mothers immediately after the birth. All cows were fed with milk containing rifampicin resistant strain of bifidobacteria (RRBIF) before delivery. Using cultivation methods total anaerobes, bifidobacteria, lactobacilli, *E. coli*, coliforms and RRBIF were determined in faecal, vaginal, amniotic fluid, saliva, tooth plaque and milk samples from cows and samples of faeces and saliva from calves. using selective media.

RRBIF strain were detected in all faecal, vaginal, amniotic fluid, saliva and tooth samples. Bifidobacteria were more concentrated in samples from mother and calves housed together. These calves had more developed probiotic microbiota at the end of experiment. Bifidobacteria were detected also in milk and breast-fed calves was more colonized by bifidobacteria. We can confirm that housing system has the impact on colonization of gastrointestinal tract of calves by bifidobacteria.

**Keywords:** Bifidobacteria; calves; milk; colonization; intestinal microbiota.



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Vývoj a stavba trávicího traktu .....</b>	<b>5</b>
3.1.1	Embryonální vývoj trávicího traktu .....	5
3.1.2	Morfologie trávicího traktu skotu .....	5
<b>3.2</b>	<b>Stádia výživy.....</b>	<b>6</b>
3.2.1	Mlezivové období .....	7
3.2.2	Mléčné období .....	7
3.2.3	Období rostlinné výživy .....	8
<b>3.3</b>	<b>Kolonizace trávicího traktu mikroorganismy .....</b>	<b>8</b>
3.3.1	Mikrobiota trávicího traktu.....	11
3.3.2	Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	14
3.3.2.1	Bifidobakterie přežvýkavců .....	15
3.3.2.2	Metabolismus bifidobakterií .....	16
<b>3.4</b>	<b>Probiotika, prebiotika a synbiotika .....</b>	<b>18</b>
3.4.1	Probiotika.....	18
3.4.2	Prebiotika.....	20
3.4.3	Synbiotika.....	21
3.4.4	Vliv antibiotik na mikrobiotu trávicího traktu.....	21
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Ustájení.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Design experimentu.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3</b>	<b>Výživa .....</b>	<b>25</b>

<b>4.4</b>	<b>Kultivační stanovení bakterií.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>44</b>



# 1 Úvod

Mikrobiota gastrointestinálního traktu je velmi rozmanitá a v průběhu života se mění. K největšímu rozvoji dochází ihned po narození. Mezi faktory ovlivňující kolonizaci trávicího traktu mláďat můžeme řadit způsob a délku porodu, hygienu v puerperálním období, výživu matky, způsob výživy mláďete nebo okolní prostředí. U řady mláďat sajících mateřské mléko tvoří dominantní složku bifidobakterie.

## **2 Cíl práce**

Hypotéza: Společné ustájení telete s matkou po porodu bude mít vliv na osídlení trávicího traktu mláděte bifidobakteriemi.

Cílem diplomové práce bylo ověřit, zda má společného ustájení telete s matkou po porodu významný vliv na množství bifidobakterií v trávicím traktu mláďat v chovu mléčného skotu.

## 3 Literární řešerše

### 3.1 Vývoj a stavba trávicího traktu

Trávicí nebo také gastrointestinální trakt je soustava orgánů, které se podílejí na příjmu, zpracování a vylučování potravy.

#### 3.1.1 Embryonální vývoj trávicího traktu

Gastrointestinální trakt (GIT) vzniká během gastrulace z endodermu, později se přidávají struktury ze všech zárodečných vrstev. Embryonálně je založen jako jednoduchá trubice, která se mezi 3-4 týdnem rozdělí na přední, střední a zadní střevo.

Z předního střeva vznikne jícen, žaludek, játra, žlučník se žlučovody, pankreas a proximální část *duodena*. Ze středního střeva distální část *duodena*, lačník, kyčelník, slepé střevo, apendix, vzestupný kolon tlustého střeva a část příčného kolonu. Ze zadního střeva je vytvořena část příčného kolonu, sestupného kolonu a análního kanálu (Carlson 2013).

#### 3.1.2 Morfologie trávicího traktu skotu

Trávicí soustava je fylogeneticky přizpůsobena druhu přijímané potravy. Základ tvoří trávicí trubice, která se dělí na dutinu ústní, hltan, jícen, žaludek a střevo. Dutina ústní (*cavum oris*) je ohraničena pysky, horní pysk spolu s hrotem nosu tvoří mulec (Marvan et al. 2003).

Pro skot je typická absence horních řezáků (*dentes incisivi*), které jsou nahrazeny skusnou deskou sloužící k rozmělnění potravy. Zubní vzorec skotu je 0033/3133. Na ústní dutinu navazuje hltan (*pharynx*), ve kterém je uložen Waldeyerův lymfatický okruh, imunitní bariéra pro trávicí a dýchací soustavu.

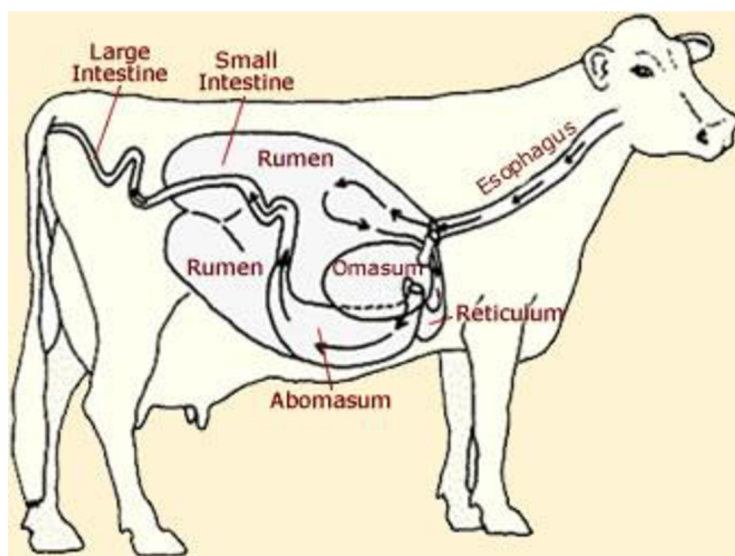
Jícen (*esophagus*) spojuje hltan s bachorem, peristaltickými vlnami zde dochází k posunu potravy směrem k bachoru a antiperistaltickými směrem k ústní dutině k regurgitaci. Žaludek je vícekomorový, složený ze tří předžaludků bachoru (*rumen*), čepce (*reticulum*) a knihy (*omasum*) a vlastního žaludku – slezu (*abomasum*). Tím se řadí mezi polygastrická zvířata (obrázek č. 1).

Bachor je největší předžaludek, jeho objem dosahuje 100–130 l (Skřivánek 2001) a dochází zde k fermentaci potravy pomocí mikroorganismů na zažítinu za vzniku těkavých mastných kyselin (SCFA), sloužících jako zdroj energie.

U mláďat přežvýkavců se ve stěnách předžaludků se nacházejí žlaby, které se při nasávání mléka uzavřou v trubici a vedou mléko přímo do slezu telete, zde dochází k jeho trávení. Předžaludky se zapojují do procesu trávení až poté, co telata začnou přijímat pevnou stravu (König & Liebich 2002). Ve výjimečných případech může docházet ke špatnému uzavírání žlabů a tím způsobeného pití do bachoru. Tento jev není fyziologický a je spojen s patologickými projevy, např. nadýmání, které může vyústit až v úhyn. Je proto bezpodmínečně nutné dodržovat správnou techniku napájení se zapojením cucáku, která tomuto jevu pomáhá předcházet. V intenzivním odchovu zpravidla bývá telatům předložen startér a seno nebo sláma ve věku 5 dní. Telata se je postupně učí po malých dávkách přijímat.

Do skončení období mléčné výživy se proto u mláďat přežvýkavců bachorové papily vyvíjejí minimálně a jejich trávení probíhá stejně jako u monogastrů.

**Obrázek č. 1** Schématické znázornění předžaludků a žaludku skotu (<http://vetstudentresearch.blogspot.com/2015/05/digestive-physiology-and-anatomy-of-cows.html>)



Rozdílem oproti monogastrickým zvířatům je stavba a délka střev. U skotu je délka střeva až 20násobkem délky těla (Marvan et al. 2003), dochází zde k enzymatickému trávení již fermentované zažitiny a jsou jím stráveni i prvoci a bakterie (Geigerová et al. 2014) pocházející z jiných částí trávicího ústrojí. Ze slezu vychází dvanáctník (*duodenum*), na něj navazuje lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*), společně tvoří tenké střevo (*intestinum tenue*). Na něj navazuje střevo tlusté (*intestinum crassum*), složené ze vzestupného (*colon ascendens*), příčného (*colon transversus*) a sestupného kolonu (*colon descendens*), který přechází v rektum (*rectum*). Rektum končí trávicí trubice a ústí ven z těla.

### 3.2 Stádia výživy

V období od narození do odstavu je trávení mláďat přežvýkavců specifické a blíží se fyziologicky monogastrickým zvířatům. Tato období označujeme jako mlezivové a následně mléčné. Po odstavu přechází tele do období rostlinné výživy. Během těchto období se rozhoduje o budoucí užitkovosti, proto je třeba výživu mladého skotu nepodceňovat. U mléčných plemen skotu převládá intenzivní způsob odchovu. Telata jsou po porodu odebrána matkám a umístěna do venkovních individuálních boxů (VIB). Zde jsou krmena jednotlivě směsným pasterovaným mlékem nebo mléčnou náhražkou, což zajišťuje přehled o množství přijatého mléka. Individuální ustájení také znemožňuje vzájemné olizování a tím zabraňuje přenosu patogenů způsobujících zejm. průjmová onemocnění. Ze stejných důvodů je nutné po

každém vyskladnění VIB řádně vydezinfikovat a pravidelně měnit a sanitovat místa stání, aby se předešlo přílišné mikrobiální zátěži. Po odstavu jsou přesunuta do skupinového ustájení, kde dochází k socializaci a vytvoření sociálních skupin (Sumner & von Keyserlingk 2018). Naproti tomu u masných plemen skotu je využíván zejm. extenzivní způsob odchovu, kdy tele zůstává s matkou na pastvině a sají její mléko až do odstavu.

### 3.2.1 Mlezivové období

Začíná okamžikem narození telete. Jedná se o napojení telete kolostrem, popř. mlezivovou náhražkou a následně napájení přechodným mlékem. Trvá přibližně prvních 7 dní života telete (Phillips 2002). V intenzivním chovu bývá zkráceno pouze na jedno nebo dvě napojení mlezivem, poté telata přecházejí rovnou do mléčného období. Skot má syndesmochoriální typ placenty, přes kterou nedochází k průchodu protilátek z krve matky na plod. Telata se proto rodí téměř bez imunoglobulinů – hypogamaglobulinemická (Beam et al. 2009). Proto je napojení mlezivem od matky nepostradatelným a nejdůležitějším krokem do života telete. Dochází při něm k pasivní imunizaci, resorbci kolostrálních imunoglobulinů sliznicí tenkého střeva. Absorbční schopnost střeva se postupem času snižuje. Dochází ke kolonizaci střev bakteriemi, vyloučení trávicích enzymů a po 6 hodinách od porodu je schopnost prostupu protilátek již pouze 50 % původní kapacity (Cortese 2009).

### 3.2.2 Mléčné období

Mléčné období navazuje na mlezivové období, tele je krmeno pasterovaným mlékem nebo mléčnou náhražkou a je ustájeno ve VIB (obrázek č. 2).

**Obrázek č. 2** Ustájení ve venkovních individuálních boxech (foto: Markéta Lašková)



Toto období trvá do odstavu, který se dnes standartně provádí ve 2 měsících věku. Telatům se v tomto období předkládá ad libitně voda a startér, což jsou peletované nebo strukturované směsi pro časný odstav telat (ČOT), díky jehož konzumaci dochází k rozvoji

bachorových papil a aktivního povrchu bachoru a voda oboje ad libitně. Peletovaný startér je vhodnější, nedochází u něj k přebírání. Ke startéru je možné předkládat řezanou slámu ideálně ovesnou (Bach 2018).

Odstav telat je vhodné započít v individuálních boxech, po dokončení odstavu lze telata přemístit do venkovních skupinových boxů (VSB), které jsou vidět na Obrázku č. 3. Telata přemístěná ihned po odstavu přijímala více startéru a trpěla menším množstvím respiračních onemocnění (Bach et al. 2010)



**Obrázek č. 3** Venkovní skupinové boxy (foto: Markéta Lašková)

### 3.2.3 Období rostlinné výživy

V tomto období již přijímají telata objemné krmivo, zejm. siláž nebo senáž doplněné o strukturální složku. Tou může být řezaná sláma, seno nebo startér. Je proto důležité, aby bachorové papily a klky byly dostatečně rozvinuté a povrch bachorové sliznice co největší. Velikost povrchu bachorové sliznice je přímo úměrná množství vstřebaných SCFA (Bach et al. 2010).

## 3.3 Kolonizace trávicího traktu mikroorganismy

Podle dříve dostupných informací začíná kolonizace GIT okamžikem narození a trávicí trakt, v prenatálním období sterilní, začne být osidlován mikrobiotou matky a okolního prostředí (Leahy et al. 2005)

Naproti tomu podle nejnovějších poznatků kolonizace trávicího traktu začíná již v prenatálním období. Již dříve byla bakteriální DNA nalezena ve většině vzorků mekonia, což naznačovalo expozici bakteriemi *in utero* (Martin et al. 2016). Díky tomu můžeme předpokládat, že bakteriální složení mekonia odráží mikrobiální prostředí *in utero*. Není však

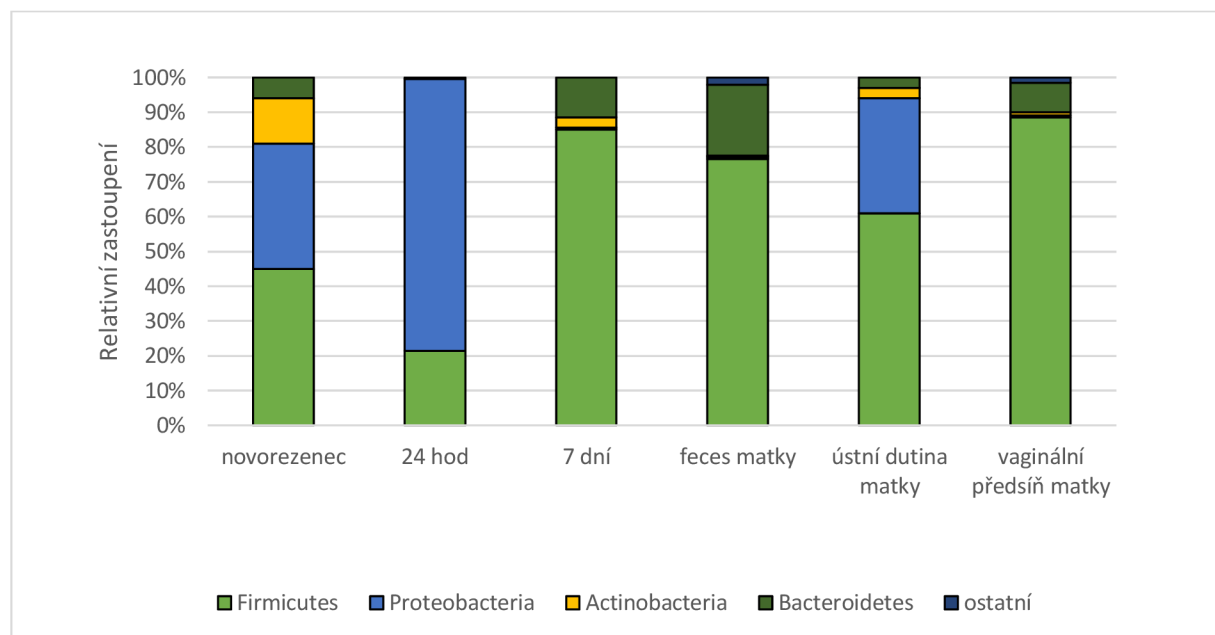
zatím přesně známo, jakými mechanismy zde ke kolonizaci placenty, plodové vody a plodu dochází. Nejpravděpodobnější je přenos z matčiny střevní sliznice do krevního řečiště a odtud do orgánových soustav plodu. Tato hypotéza byla již potvrzena u myši (Wilczyńska et al. 2018). Bakteriální kolonizace fetálního střeva je zdrojem mikrobiální stimulace a může poskytnout primární signál pro zrání vyváženého postnatálního vrozeného i adaptabilního imunitního systému (Wilczyńska et al. 2019). Vystavování matky různorodé mikrobiotě během březosti se jeví jako prospěšné, zatímco antimikrobiální léčba během březosti může u potomků zvýšit riziko imunologických a metabolických poruch (Alipour et al. 2018).

Po porodu se bakteriální mikrobiota střev rychle rozvíjí. Telata se nejprve kolonizují vertikálně od matky, přicházejí do styku s jejími exkrementy, popř. dalších zvířat ve stádě a mikrobiotou okolního prostředí. K přenosu intestinálních bakterií dochází i při sání mateřského mléka olizováním vnějšího povrchu struku. Po dosažení stabilní střevní mikrobioty se růst zastavuje a mikrobiota zůstává relativně stálá. Stabilní kolonie chrání hostitele před invazivními patogeny (Alipour et al. 2018). Celý proces kolonizace GIT je ovlivněn délkou březosti, způsobem porodu, krmením a okolním prostředím (Dogra et al. 2015).

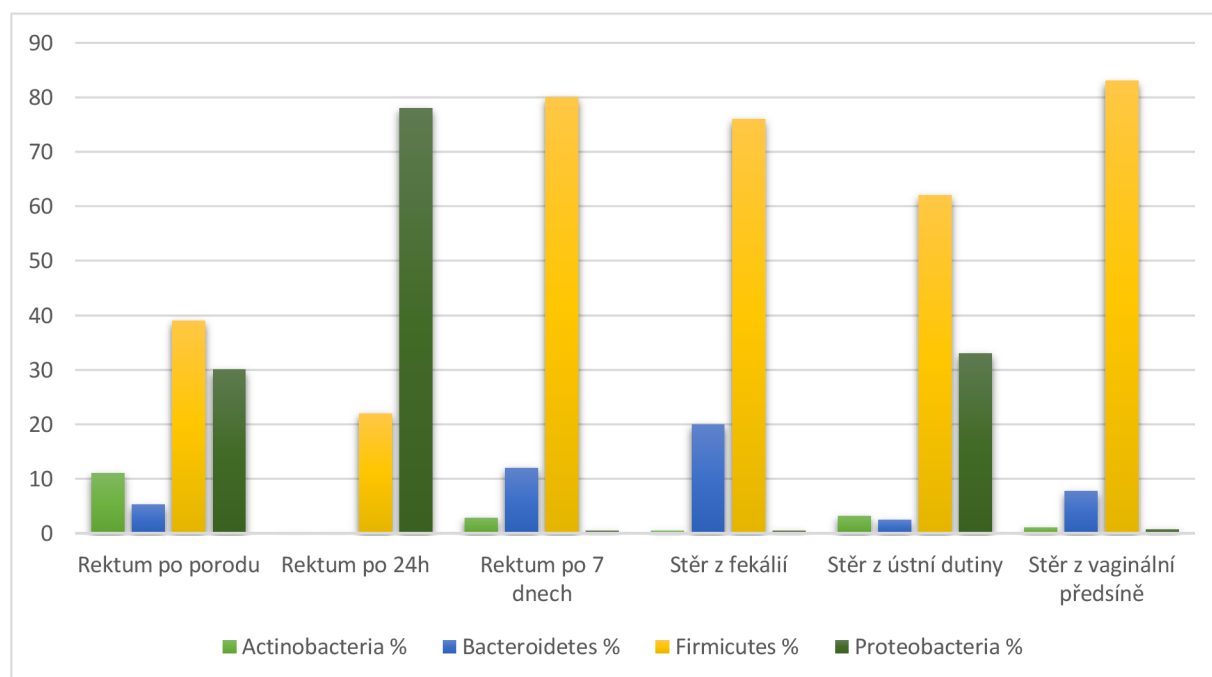
Rektální mikrobiota telat se skládá zejména z bakteriálních kmenů Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria a Bacteroidetes. Mikrobiální druhový profil se podle Alipour et al. (2018) podobá spíše orální, než fekální nebo vaginální vestibulární mikrobiotě, ale zahrnuje i typické střevní taxony. Trávicí trakt telete po porodu obsahuje kyslík, proto jsou prvními kolonizátory obvykle fakultativně anaerobní bakterie rodu *Staphylococcus*, *Enterococcus* a *Enterobacteriaceae*. Po zredukování množství kyslíku je následují obligátně anaerobní bakterie rodů *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Clostridium* (Milani et al. 2015). Alipour et al. (2018) ve své studii uvádějí, že telata jsou po porodu osídlena různorodou mikrobiotou, ta se ale rychle mění v časném postnatálním životě. Během prvního postnatálního dne je rektum telat osídleno rody *Escherichia*, *Shigella* a *Clostridia*, přičemž diverzita mikrobiálních druhů je poměrně malá. Do 7 dnů po narození se diverzita významně zvýší. Co se týče relativního množství, bakterie kmene Proteobacteria byly nahrazeny zejména zástupci Firmicutes, Bacteroidetes a Actinobacteria, včetně rodů *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Butyricoccus* a *Bifidobacterium*.

Po odstavu a ukončení období mléčné výživy se vyvine stabilní střevní mikrobiota odpovídající dospělému jedinci. U telat k tomu dochází kolem 6 měsíce věku. Běžně přítomné bakteriální rody v trávicím traktu jsou *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* a *Proteus* (Salfinger 1980; Simon & Gorbach 1984; Vaughan et al. 2000). Výsledky jedné z nejnovějších studií (Alipour et al., 2018) týkající se zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů telat a jejich matek jsou vedeny na grafu č. 1 a 2.

**Graf č. 1** Mikrobiotická kompozice trávicího traktu telat (n=21) a jejich matek (n=10) (Alipour et al. 2018)



**Graf č. 2** Procentické zastoupení bakteriálních kmenů osidlujících trávicí trakt telat (n=21) a jejich matek (n=10) v období po porodu (Alipour et al. 2018)





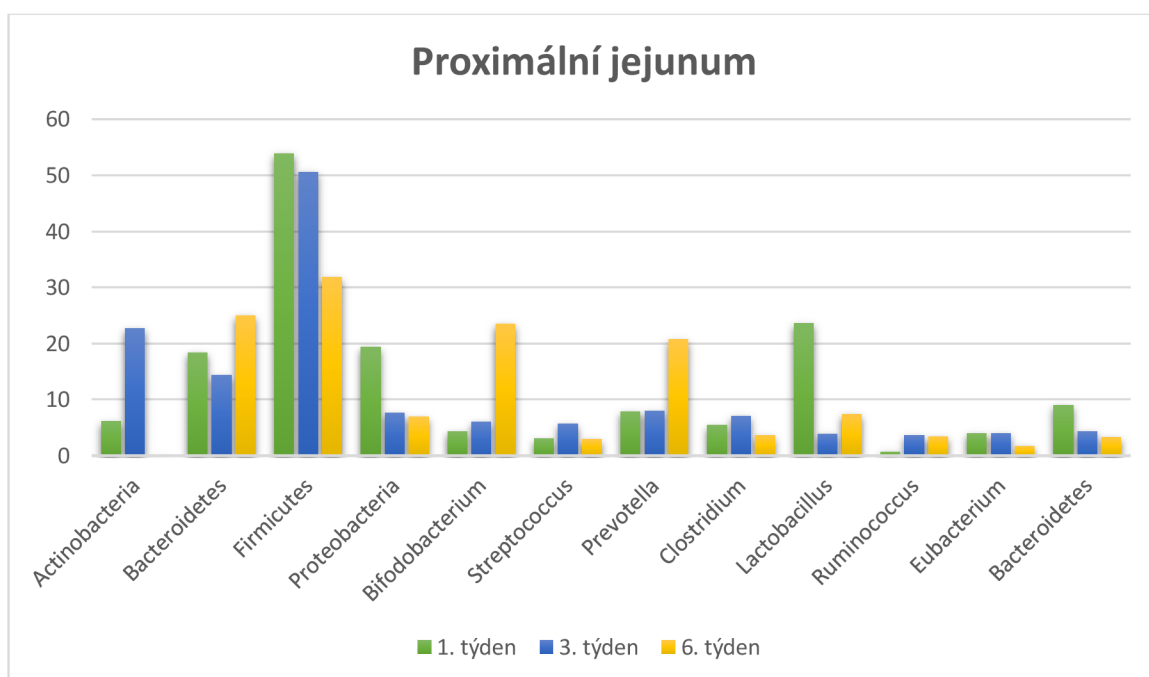
### 3.3.1 Mikrobiota trávicího traktu

Trávicí trakt je kolonizován po celé délce, avšak prostředí se v různých částech GIT výrazně liší, proto je i bakteriální mikrobiota v různých částech GIT velice odlišná. Příjem potravy probíhá ústy, kde začíná enzymatické a chemické štěpení potravy. Typickými rody obývajícími ústní dutinu jsou rody *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Micrococcus*, u mláďat ještě *Bifidobacterium* (Valdez et al. 2016). Tyto druhy dohromady tvoří stabilní biofilm pokrývající vnitřek ústní dutiny.

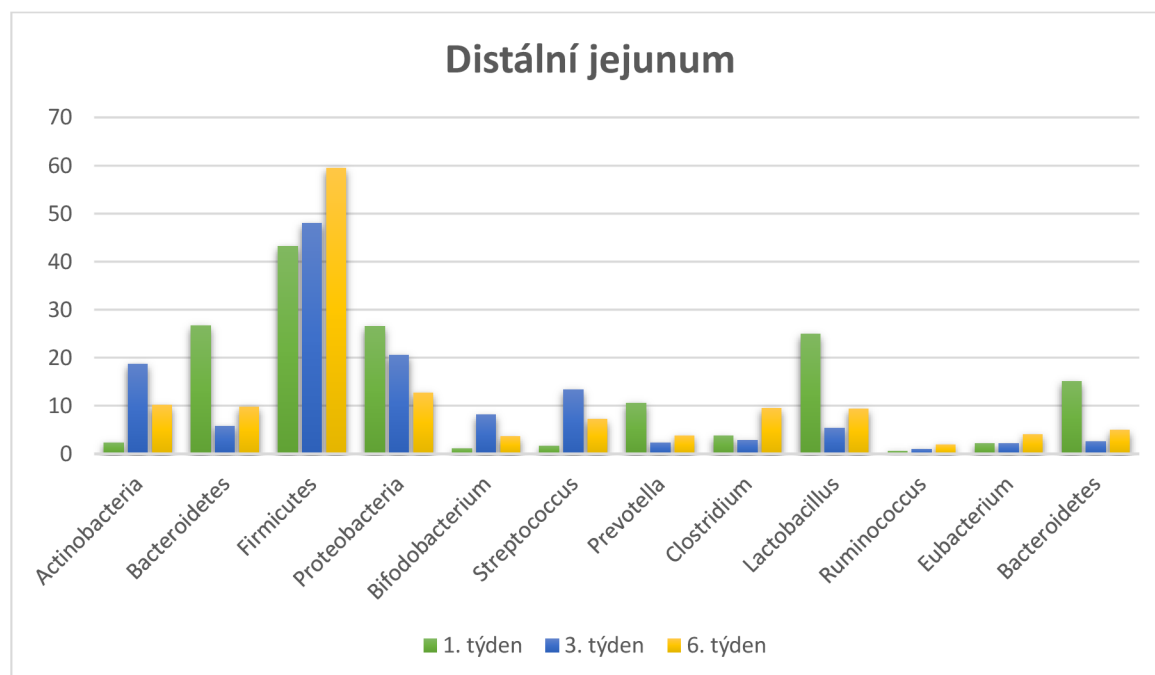
Bakterie z dutiny ústní mohou společně s potravou migrovat do bachoru přežvýkavců. V bachoru jsou zastoupeny bakterie v množství až  $10^{10} \cdot \text{ml}^{-1}$  zejm. pak bakterie kmenů *Bacteroides* a *Firmicutes*. Bachor přežvýkavců obsahuje také velké množství prvoků a to řádově  $10^5 - 10^6$  na ml a malé množství anaerobních hub (Wallace & Newbold 1992). Podrobnější popis bachorové mikrobioty nebyl předmětem této bakalářské práce, ale lze ho nalézt ve studii Tuohy & Del Rio (2014).

Mikrobiota střev novorozenečích telat obsahuje bakterie, archea, houby, prvoky a viry od prvního dne života. Dominantní mikrobiální skupinu tvoří bakterie, které osídlují střeva po celé délce a lze zde najít zástupce až 21 kmenů, 46 čeledí a 510 rodů bakterií. Čtyři bakteriální kmeny představují téměř 93 % všech identifikovaných bakterií, s podstatnou variabilitou mezi jednotlivými kmeny u různých jedinců a v různých částech trávicího traktu (Firmicutes 11 – 80 %; Bacteroidetes 0,5 – 75 %; Proteobacteria 0 – 35 %; Actinobacteria 1 – 85 %). Zastoupení jednotlivých kmenů a rodů v různých částech střeva podle studie Malmuthuge et al. (2019) lze nalézt v grafu č. 3, 4 a 5.

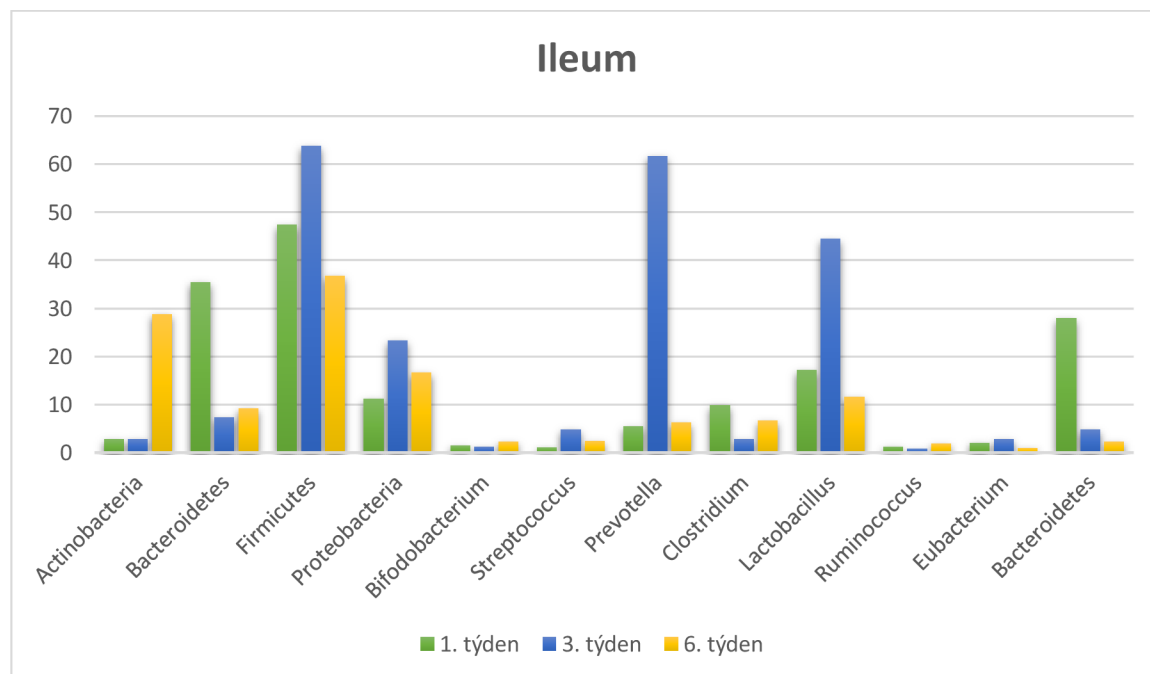
**Graf č. 3** Procentuální zastoupení kmenů a rodů bakterií proximálním jejunem telat



**Graf č. 4** Procentuální zastoupení kmenů a rodů bakterií distálním jejunum telat



**Graf č. 5** Procentuální zastoupení kmenů a rodů bakterií ileu telat



Do kmene Actinobacteria patří i rod *Bifidobacterium*, u něž byly prokázány probiotické účinky. Bifidobakterie byly dominantní skupinou fekální flóry telat po 7 dni života, kdy tvořily až 10 % celkového počtu bakterií. Nejvyšší koncentrace bakterií byly pozorovány v bacheru, slepém střevě a tlustém střevě, nejnižší ve slezu a dvanáctníku. Bifidobakterie a laktobacily vykazovaly nejvyšší schopnost přežití během průchodu žaludkem a dominovaly ve všech částech trávicího traktu (Vlková et al. 2006).

Přítomnost bifidobakterií v GIT ve vysokém počtu je spojována s dobrým zdravotním stavem hostitele. Podle studie Vlkové et al. (2006) je nejvyšší počet bifidobakterií v trávicím traktu telat přítomen od 7 dne věku, potom jejich množství pomalu klesá až do 7 týdnů věku. Nejvyšší zastoupení mají bifidobakterie v bacheru ( $7,88 \pm 0,62$  log KTJ/g), dále ve slepém ( $6,42 \pm 0,37$  log KTJ/g) a tlustém střevě ( $6,40 \pm 0,54$  log KTJ/g) (Tabulka č. 1).

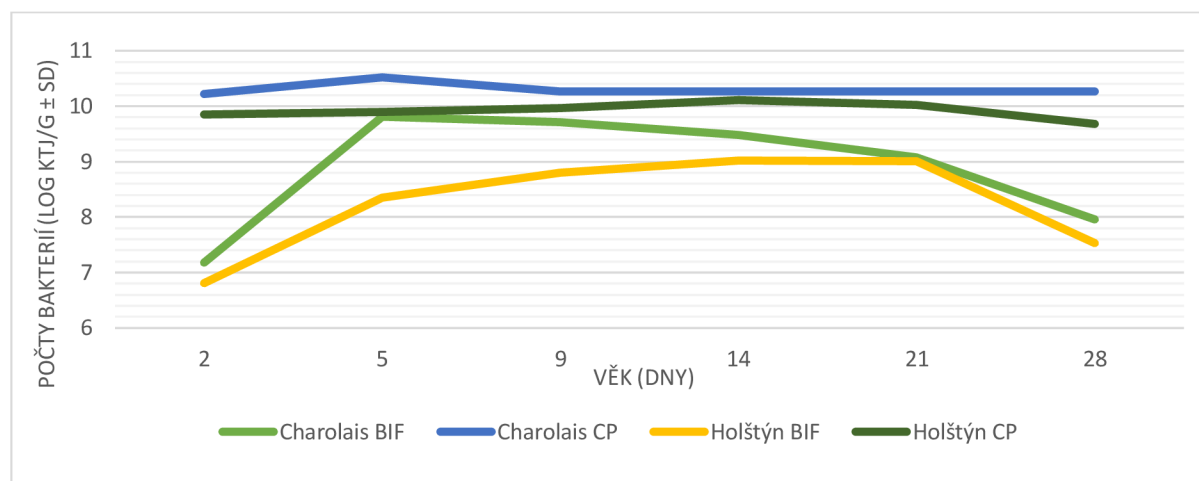
Bunešová et al. 2015 ve své studii porovnávala schopnost bifidobakterií kolonizovat GIT telat odchovávaných různým způsobem. Telata plemene Charolais v extenzivním chovu krmená výhradně mateřským mlékem dosahovala po podání probiotických kultur výrazně vyššího množství bifidobakterií, než tomu bylo u telat Holštýnského plemene v intenzivním chovu krmených kombinovanou dietou, jak je vidět na grafu č. 4.

**Tabulka č. 1** A. Koncentrace bifidobakterií (log KTJ/g  $\pm$  SD)\* ve vzorcích výkalů telat (n=38) v různém věku (3 dny až 7 týdnů); B. Rozložení bifidobakterií (log KTJ/g  $\pm$  SD) v GIT telat (n=14)

A.	věk (dny)					
	3	7 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2	49 $\pm$ 2
<i>Bifidobacterium</i>	7,67 $\pm$ 0,94	8,86 $\pm$ 0,89	8,16 $\pm$ 1,25	7,76 $\pm$ 1,22	7,40 $\pm$ 1,16	6,82 $\pm$ 0,66
B.	část trávicího traktu					
	bachor	slez	dvanáctník	kyčelník	slepé střevo	tlusté střevo
<i>Bifidobacterium</i>	7,88 $\pm$ 0,62	5,38 $\pm$ 1,04	4,04 $\pm$ 1,02	5,08 $\pm$ 0,90	6,42 $\pm$ 0,37	6,40 $\pm$ 0,54

\*SD – směrodatná odchylka, KTJ – kolonie tvořící jednotka

**Graf č. 4** Počty bakterií (log KTJ/g ± SD)\* ve výkalech telat (n=8) odchovávaných extenzivně (Charolais) a intenzivně (Holštýn).



\*SD – směrodatná odchylka; KTJ – kolonie tvořící jednotka

CP – celkový počet anaerobních bakterií; BIF – bifidobakterie

Výskyt bifidobakterií ve stolici je vysoce závislý na složení potravy. Fekální mikrobiota telat krmených výhradně mateřským mlékem je bohatá na bifidobakterie, naproti tomu u telat krmených mléčnou náhražkou kombinovanou se startérem dominovaly koliformní bakterie. Telata s nízkým počtem bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií mohou být náchylnější ke kolonizaci patogeny (Vlková et al. 2008).

### 3.3.2 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* je taxonomicky zařazen do kmene *Actinobacteria* (Tabulka č. 2) zahrnuje kolem 100 druhů a poddruhů (<http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html>).

Bifidobakterie jsou nepohyblivé, nesporulující, striktně anaerobní, grampozitivní tyčinky s vysokým obsahem C+G. Typicky mají nepravidelný tvar, často připomínají písmena V nebo Y, vyskytují se buď jednotlivě nebo tvoří řetězky či shluky (Leahy et al. 2005). Mohou se množit v teplotním rozmezí 20 – 46°C. Optimální teplota pro růst humánních bifidobakterií je 36 – 38 °C, pro zvířecí druhy je teplota vyšší 41 – 43 °C, což může souviset s fyziologicky vyšší teplotou u většiny zvířecích druhů, než je teplota lidského těla (Dong et al. 2000). Například fyziologická teplota skotu se pohybuje od 38,5 – 39,5 °C (König & Liebich 2002).

Výjimečně mohou některé druhy tolerovat kyslík, ale pouze za přítomnosti oxidu uhličitého (Wilson 2008). Optimální pH pro růst je 6,4 – 7, určité druhy mohou tolerovat pH až 4,5 nebo 8,5 (Biavati et al. 2000). Obývají různé ekologické niky, jako je humánní a zvířecí GIT, dutina ústní, vagina nebo střeva sociálního hmyzu (Ventura et al. 2004), mohou být

nalezeny i v krvi nebo odpadních vodách, pravděpodobně v důsledku znečištění (Lugli et al. 2017).

#### **Tabulka č. 2** Taxonomické zařazení rodu *Bifidobacterium*

(<http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html>)

<b>Taxonomická jednotka</b>	<b>Název</b>
<b>Kmen</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Třída</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Řád</b>	<i>Bifidobacteriales</i>
<b>Čeleď</b>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Bifidobacterium</i>
<b>Druh</b>	<i>Bifidobacterium</i> spp.

Většina bifidobakterií je vázána pouze na místo výskytu, např. střevo nebo ústní dutinu, ale některé bifidobakterie jsou navíc i druhově specifické. Ty pak lze najít pouze u konkrétních druhů zvířat, např. *B. cuniculi* u králíků, *B. gallinarum* u kuřat, *B. asteroides* u včel nebo *B. longum* subsp. *suis* u prasat. (Russell et al. 2011).

##### 3.3.2.1 Bifidobakterie přežvýkavců

Druhové zastoupení bifidobakterií u přežvýkavců je velmi rozmanité. Mezi hostitelsky specifické druhy patří *B. boum*, *B. merycicum*, *B. ruminantium*, vázané na bachor přežvýkavců, seznam druhů bifidobakterií vyskytujících se u skotu je uveden v tabulce č. 3.

Dle Paily et al. 2020 je mikrobiota GIT klinicky zdravého skotu tvořena dominantně probiotickými kulturami. A to zejména laktobacily (41,91%) a bifidobakteriemi (33,14%). Dále se obvykle vyskytují zástupci rodů *Lactococcus* ssp., *Enterococcus* ssp., *Bacillus* ssp., v nízké koncentraci se mohou vyskytnout i zástupci rodů *Enterobacter* ssp. nebo *Staphylococcus* ssp. V mléce přežvýkavců jsou bifidobakterie zastoupeny z 24,39 % (Paily et al. 2020). Nejčetnější zástupce bifidobakterií je *B. adolescentis* (51,61 %), dále *B. longum* ssp. *infantis* (15,32 %), *B. longum* ssp. *longum* (11,29%), *B. lactentis* (8,87 %), *B. bifidum* (7,26 %) a *B. breve* (5,65 %).

Tabulka č. 3 Nejvýznamnější zástupci bifidobakterií u skotu (Matterelli et al. 2017)

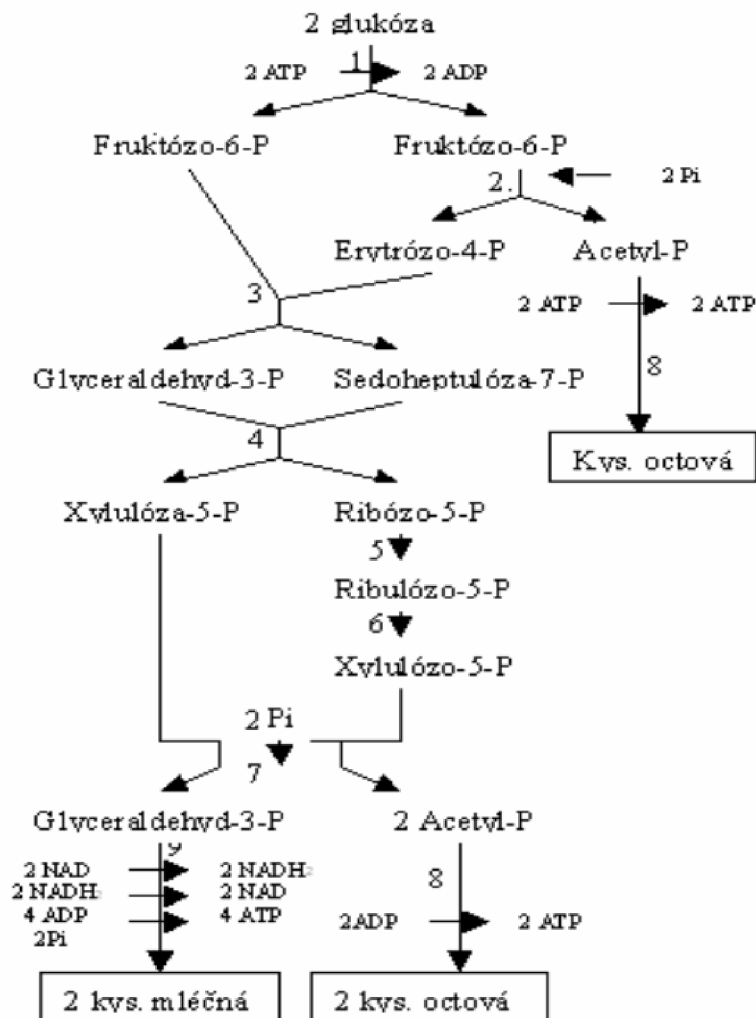
Druh	Výskyt
<i>B. adolescentis</i>	bachor skotu, střeva dospělých jedinců
<i>B. bifidum</i>	střeva dospělých jedinců
<i>B. boum</i>	bachor přežvýkavců
<i>B. breve</i>	střevo mláďat
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	střeva mláďat
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i>	telecí výkaly, střeva dospělých jedinců
<i>B. merycicum</i>	bachor skotu
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	bachor skotu
<i>B. ruminantium</i>	bachor skotu

### 3.3.2.2 Metabolismus bifidobakterií

Bifidobakterie patří mezi chemoorganotrofy a mají fermentativní typ metabolismu (Dworkin et al. 2006). Patří mezi sacharolytické bakterie a produkují bohatou škálu enzymů schopných hydrolyzovat monosacharidy (glukózu, galaktózu a jiné), disacharidy (sacharóza, laktóza, maltóza aj.). Některé druhy fermentují i oligosacharidy jako fruktooligosacharidy, mucin a pektin nebo polysacharidy jako škrob (Ventura et al. 2007).

Bakterie čeledi *Bifidobacteriaceae* mají svou metabolickou dráhu, označovanou jako fruktózo-6-fosfátová dráha. Specifická pro ni je přítomnost enzymu fruktóza-6-fosfátfosfoketoláza (F6PPK) sloužícímu pro degradaci fruktózy-6-fosfátu. Tento enzym může sloužit k rodové identifikaci bifidobakterií (Biavati et al. 2012) (Obrázek č. 4). Hlavními konečnými produkty této dráhy jsou kyselina mléčná a kyselina octová, které vznikají v poměru 2:3. Dalšími konečnými metabolity této dráhy mohou být kyselina mravenčí, etanol a kyselina jantarová, jejichž produkce může ovlivnit konečný poměr vzniklých kyselin octové a mléčné. Oxid uhličitý se touto dráhou nevytváří, vzniká však při degradaci glukonátu (Ventura et al. 2004).

Některé druhy mohou syntetizovat vitamíny skupiny B (thiamin B1, niacin B3, Pyridoxin B6, kyselina listová B11) a alespoň 19 aminokyselin. K růstu a množení většiny zástupců izolovaných z humánního GIT je nutná přítomnost vitamínu B2 a kyseliny pantotenové (Cronin et al. 2011). Pomocí různých druhů deamináz a dehydratáz mohou tyto bakterie fermentovat aminokyseliny. Druh *B. longum* vytváří více než 20 peptidáz, které odštěpují aminokyselinové zbytky z proteinových substrátů (Ventura et al. 2004).



**Obrázek č. 4** Schéma metabolické dráhy štěpení fruktózy-6-fosfát fruktózou-6-fosfátfosfoketolázou (1. hexokináza a fruktózo-6-fosfát izomeráza; 2. fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza; 3. transaldoláza; 4. transketoláza; 5. ribózo-5-fosfát izomeráza; 6. ribulózo-5-fosfát-3-epimeráza; 7. xylulózo-5-fosfoketoláza, 8. acetát kináza; 9. enzymy Embden-Meyerhof-Parnasovy dráhy)(Biavati et al. 2012)

Zdroje živin pro růst a kultivaci bifidobakterií jsou např. threonin, kvasniční extrakt, cystein, pepton, dextrin, maltóza,  $\beta$ -glycerolfosfát. Mezi bifidogenní faktory podporující rozvoj těchto bakterií v trávicím traktu patří sacharidy obsahující N-acetylglukózaminy, fruktooligosacharidy, laktoferin, laktulóza a laktinol, rafinóza, stachyoza, inulin, xylooligosacharidy (D-xylan),  $\kappa$ -kasein, aj. Fruktooligosacharidy a inulin jsou bifidobaktériemi metabolizovány přednostně v porovnání s jinými oligosacharidy. Tyto látky

prochází v nezměněné podobě horními částmi trávicího traktu až do střeva, kde stimuluje bifidobakterie (Rossi et al. 2005).

Vysoká hladina bifidobakterií ve střevě je žádoucí, protože bakterie patřící do tohoto rodu mají stabilizující účinek na střevní mikrobiotu, poskytují bariérové účinky proti kolonizaci patogenů, produkují inhibiční látky, stimuluje imunitní systém a zlepšují kontrolu zánětlivé odpovědi. Nerovnováha ve složení střevní mikrobioty by mohla vést k poruchám trávení a riziku průjmů způsobených mikrobiálními infekcemi, které jsou převažujícími zdroji ekonomických ztrát a úmrtnosti u hospodářských zvířat.

Tyto prospěšné bakterie dokážou prospívat zdraví řadou pozitivních vlivů po dobu měsíců, let nebo dokonce až po celý život (Musilová et al. 2015). Proto by bylo ideální přidávat je ve formě probiotik do krmné dávky. Další možností pozitivního ovlivnění střevní mikrobioty je podávání prebiotik, tedy nestravitelných složek krmiva, která prochází do tlustého střeva, kde pozitivně ovlivňují mikrobiotu trávicího traktu (Qiang et al. 2009).

## **3.4 Probiotika, prebiotika a synbiotika**

### **3.4.1 Probiotika**

Probiotiky můžeme podle WHO (World health organization) a FAO (Food and Agriculture Organization OSN) nazvat živé mikroorganismy, které, když jsou podávány v odpovídajícím množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos (WHO & FAO 2001). Probiotika pozitivně ovlivňují střevní mikrobiotu. Mezi nejvíce prostudovaná a nejčastěji využívaná probiotika patří bakterie rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, popř. *Enterococcus* (Tabulka č. 4). Probiotika u mláďat přežvýkavců obecně cílí na střeva, protože bachor ještě není vyvinut. Inkorporace probiotik do stravy pro mladé tele zabraňuje vzniku možných nerovnováh v normální mikrobiotě ve střevním traktu a zlepšuje růst mladých telat prevencí průjmu (Bunešová et. al 2011).



**Tabulka č. 4** Druhy prostudované k využití jako probiotika u přežvýkavců (Gaggia et al. 2010)

<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>B. longum ssp. longum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>B. animalis ssp. animalis</i>	<i>L. casei ssp. casei</i>	<i>E. faecium</i>
<i>B. lactis ssp. lactis</i>	<i>L. fermentum</i>	
<i>B. thermophilum</i>	<i>L. brevis</i>	
<i>B. pseudolongum ssp. pseudolongum</i>	<i>L. plantarum</i>	
	<i>L. rhamosus</i>	
	<i>L. salivarius</i>	

Vlastnosti probiotik mohou být druhově či dokonce rodově specifické, existuje však řada probiotických efektů, které jsou striktně kmenově specifické a účinek se vztahuje pouze na jeden konkrétní kmen. To je i případ produkce specifických bioaktivních látek, endokrinologických, imunologických nebo neurologických vlastností. Mezi druhově specifické vlastnosti patří syntéza vitamínů, enzymatická aktivita, posílení střevní bariéry, neutralizace karcinogenních látek aj.

Jako běžné, rodově specifické, probiotické vlastnosti označujeme produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), vliv na ustálení střevní mikrobioty, konkurenční vyloučení patogenů, regulaci střevního tranzitu nebo zvýšenou tvorbu enterocytů. Tyto vlastnosti můžeme nalézt téměř u všech probiotických druhů (Hill et al. 2014; Tabulka č. 5).

**Tabulka č. 5** Rozdělení specifických vlastností probiotik (Hill et al. 2014)

<b>1. Vzácné kmenově specifické vlastnosti</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Neurologické vlastnosti</li><li>• Imunologické vlastnosti</li><li>• Endokrinnologické vlastnosti</li><li>• Produkce specifických bioaktivních molekul</li></ul>
<b>2. Druhově specifické vlastnosti</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Syntéza vitamínů</li><li>• Přímý antagonismus proti patogenním nebo podmíněně patogenním mikroorganismům</li><li>• Posílení střevní bariéry</li><li>• Hydrolyza nebo dehydrogenace žlučových kyselin</li><li>• Enzymatická aktivita</li><li>• Neutralizace karcinogenních látek</li></ul>
<b>3. Běžně se vyskytující vlastnosti</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Tvorba SCFA</li><li>• Regulace střevního tranzitu</li><li>• Ustálení střevní mikrobioty</li><li>• Konkureční vyloučení patogenů</li><li>• Zvýšená tvorba enterocytů</li></ul>

### 3.4.2 Prebiotika

Prebiotika jsou látky, které nejsou stravitelné, ale jsou selektivně metabolizovány střevními bakteriemi. Tím podporují rozvoj pozitivně působících bakterií a mají tedy pozitivní vliv na zdraví hostitele. K tomu je zapotřebí, aby látka prošla v nezměněném stavu až do tlustého střeva, kde bude metabolizována probiotickými bakteriemi rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* a nebyla hydrolyzována v žaludku ani absorbována v tenkém střevě (Manning et al. 2004). Toho lze dosáhnout především u mláďat přežvýkavců, která nedisponují funkčním bachorem, protože u dospělých jedinců je většina látek degradována bachorovou mikrobiotou (Gaggia et al. 2010).

Mezi látky s prokázaným prebiotickým účinkem můžeme zařadit fruktooligosacharidy (FOS), inulin, galaktooligosacharidy (GOS), sojové oligosacharidy (SOS), mannanoligosacharidy (MOS), xylooligosacharidy, glukooligosacharidy, laktulosa a isomaltooligosacharidy (Qiang et al. 2009)

### 3.4.3 Synbiotika

Synbiotiky nazýváme směs probiotik a k nim selektivně vhodných prebiotik. Využíváme u nich synergického účinku obou složek, který přináší pozitivní efekt na dobu přežití probiotických bakterií a jejich lepší průchod trávicím traktem (De Preter et al. 2011).

### 3.4.4 Vliv antibiotik na mikrobiotu trávicího traktu

Bylo prokázáno, že podání léčiv, zejm. antibiotik má vliv na složení a aktivitu střevní mikrobioty. Terapeutické i profylaktické používání antibiotik je běžnou strategií ke snížení časné morbidity a mortality způsobené průjmem. Antibiotika lze podávat buď přímo, nebo v mléce nebo v mléčné náhražce náhražce (Pardon et al. 2013).

Možné riziko vzniku mikrobiální rezistence a potenciální rizika pro lidské zdraví a bezpečnost potravin, v důsledku používání antimikrobiálních látek v živočišné výrobě vedlo k přísnějším legislativním předpisům pro jejich použití v odvětví živočišné výroby. Zákaz používání antibiotik a ionoforů v živočišné výrobě jako látek podporujících růst byl zaveden do legislativy Evropskou unií (Úřední věstník Evropské unie 2003). Kromě zneškodnění zamýšleného patogenu dochází i k narušení rovnováhy střevních bakterií, což může vést až k nežádoucím vedlejším účinkům (Venema & do Carmo 2015). Dochází k poklesu původních druhů obývajících habitat, což umožní kolonizaci patogenními druhy a jejich následné přemnožení.

Alternativou k antibiotikům u průjmových telat je podávání přírodních doplňkových látek, jako jsou bylinné extrakty a probiotika (Renaud et al. 2019). Po podání probiotik následuje nárůst probiotických rodů bakterií *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které stabilizují rovnováhu střevní mikrobioty a chrání před přemnožením patogenních druhů způsobujících např. průjmová onemocnění (Hofírek et al. 2009). Probiotika mohou být použita buď přímo pro vytěsnění enterotoxigenní *E. coli* ze střevní stěny obsazením jejího habitatu nebo jako podpora růstu zdravé bakteriální populace, která následně vyloučí koliformy ze střev.

*L. acidophilus* redukuje množství koliformních bakterií ve střevech telat, tím redukuje příznaky průjmu a zastavuje hubnutí a zvyšuje přírůstek živé hmotnosti. Kmen *L. acidophilus* původně izolovaný z trávicího traktu telat je účinnější než stejný kmen izolovaný z GIT prasat. Směs *L. acidophilus* a *E. faecium* snížil výskyt průjmů o téměř 70 % a úmrtnost o 99 % při podávání telatů od narození do 5 dní věku (Wallace & Newbold 1992).

V prvním měsíci života jsou jednou z běžných příčin smrti telete choroby, jako je průjem způsobený patogeny. Telecí průjem může být způsoben buď jednotlivými patogeny, nebo často kombinací patogenů. Běžnými příčinami průjmu u telat jsou *Cryptosporidium parvum*, rotavirus, koronavirus, *Escherichia coli* nebo *Giardia duodenalis*. Tyto patogeny jsou zodpovědné za většinu (56,5%) úmrtí telat během období před odstavením (National Animal Health Monitoring System - NAHMS 2007). Nejvýznamnější příčinou průjmu u telat jsou paraziti prvoků *Cryptosporidium parvum* a *Giardia duodenalis* (kryptosporidíóza a giardiáza) Tito paraziti mohou vážně ovlivnit zdraví telete, což vede k letargii, dehydrataci a sníženému příjmu krmiva, absorpci živin a výkonnosti (Shaw et al. 2020).

Telata, jimž jsou probiotika přidávána do mleziva a mléčné náhražky mají vyšší tělesnou hmotnost. Začlenění kombinace probiotik a fytobiotik jako doplňkové látky má

významné příznivé účinky na průměrný denní přírůstek, příjem startéru a celkový příjem sušiny (Stefańska et al. 2021).

V současné době se k preventivnímu podávání probiotik u telat nepřístupuje zejména z ekonomických důvodů (Alawneh et al. 2020), časté je ale podávání prebiotik jako krmných aditiv, která nabízí celá řada výrobců. V případě propuknutí průjmového onemocnění u telete je podání probiotika vhodným doplňkem k léčbě.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Ustájení

Jako experimentální stáj byla použita Mléčná farma v Uhelné Příbrami. Experiment probíhal v porodní stáji, která je rozdělena do 15 kotců s hlubokou podestýlkou. Krávy jsou naskladňovány 14 – 21 dní před plánovaným termínem otelení. Kotce byly před naskladněním dojníc důkladně asanovány, vysypány dolomitickým vápencem a nastlány čistou slámou. Pokus probíhal v jednom vyčleněném kotci, kde se nacházely pouze dojnice, které byly součástí experimentu. Celkem bylo do skupiny A zařazeno 6 dojníc a do skupiny B 6 dojníc. Krávy ze sk. A ihned po porodu společný kotec opustily a byly převedeny na rozdoj. Krávy ze skupiny B zůstaly ve společném kotci i se svým teletem po dobu 24h do ukončení experimentu. Poté byly také převedeny na rozdoj a tele umístěno do VIB. Pět dní před plánovaným termínem porodu bylo dojnícím podáváno 250 ml mléka prokysaného kmenem rifampicinrezistentních bifidobakterií (RRBIF) *B. animalis* ssp. *animalis* 23II. Krávy dostávaly mléko jednou denně, až do termínu porodu. Mléko bylo kravám nalito přímo do krku. Během porodu, či vzápětí po porodu byl proveden stěr z vagíny, zachycení plodové vody, stěr zubního plaku a slin z ústní dutiny a odběr výkalů z rektu. Tyto vzorky v množství 1 g byly odebírány do zkumavek s anaerobně připraveným Wilkins-Chalgren bujónem a glycerinem v poměru 6 ml bujónu a 3 ml glycerinu (Tabulka č. 8) a paralelně do mikrozkušavek v množství 0,5 g k izolaci DNA a její následné analýze.

### 4.2 Design experimentu

Krávy byly rozděleny na dvě skupiny. Skupině A (n=4) bylo tele okamžitě po porodu odebráno, umístěno do termoboxu a nakrmeno mlezivem jiné krávy, která nebyla součástí experimentu a bifidobakterie jí nebyly podávány. Telata dostala mlezivo ohřáté na teplotu 37°C k vypití cucákem, pokud nebyla ochotna je přijmout bylo jim mlezivo podáno sondou v množství minimálně 3 l. Skupině B (n=6) byla telata ponechána po dobu 24 hod. a bylo jim umožněno sát mlezivo přímo od matky, nechat se olizovat a interagovat s prostředím

Dva dny po porodu bylo oběma skupinám krav odebráno mléko a telatům stěry zubního plaku a slin a odběr výkalů z rektu stejným způsobem jako je popsáno výše. Tytéž odběry byly provedeny 5. den po porodu (Tabulka č. 6). Vzorky byly ihned po odběru zamrazeny a uchovány k dalšímu zkoumání.

**Tabulka č. 6** Schéma odebírání vzorků

<b>Vzorek č.</b>	<b>Zvíře</b>	<b>Čas</b>	<b>Typ vzorku</b>
<b>1</b>	kráva A	den porodu	stěr ze zubů, sliny
<b>2</b>			stěr z vaginy
<b>3</b>			výkaly z rekta
<b>4</b>	tele A oddělené od matky	2. den po porodu	stěr ze zubů, sliny
<b>5</b>			výkaly z rekta
<b>6</b>	kráva A	2. den po porodu	mléko
<b>7</b>	tele A oddělené od matky	5. den po porodu	stěr ze zubů, sliny
<b>8</b>			výkaly z rekta
<b>9</b>	kráva A	5. den po porodu	mléko
<b>10</b>	kráva B	den porodu	stěr ze zubů, sliny
<b>11</b>			stěr z vaginy
<b>12</b>			výkaly z rekta
<b>13</b>	tele B zůstalo s matkou	2. den po porodu	stěr ze zubů, sliny
<b>14</b>			výkaly z rekta
<b>15</b>	kráva B	2. den po porodu	mléko
<b>16</b>	tele B zůstalo s matkou	5. den po porodu	stěr ze zubů, sliny
<b>17</b>			výkaly z rekta
<b>18</b>	kráva B	5. den po porodu	mléko

### 4.3 Výživa

Na porodně byly krávy krmeny krmnou dávkou pro suchostojné krávy (Tabulka č. 7), po otelení se přesunuly do jiné části stáje, kde přešly na krmnou dávku pro krávy v rozdoji (Tabulka č. 8). Změna složení krmné dávky neovlivní výsledky pokusu, protože zkoumaný kmen bifidobakterií je označen a do krmné dávky nejsou probiotika cíleně přidávána.

**Tabulka č. 7** Krmná dávka suchostojných krav a krav na porodně

<b>Komponenta</b>	<b>Množství v [kg]</b>
<b>Sláma</b>	2,5
<b>Seno</b>	1
<b>Jetelotravní senáž</b>	2,5
<b>Travní senáž</b>	5,5
<b>Směs DPP (dojnice příprava porod)</b>	3,5
<b>Siláž</b>	10
<b>Kukuřice CCM</b>	1,2

**Tabulka č. 8** Krmná dávka pro krávy v rozdoji

<b>Komponenta</b>	<b>Množství v [kg]</b>
<b>Sláma</b>	0,5
<b>Seno</b>	1,5
<b>Jetelotravní senáž</b>	3,5
<b>Travní senáž</b>	5,5
<b>Směs DOVP (dojnice vysokoprodukční)</b>	8
<b>Siláž</b>	20
<b>Kukuřice CCM</b>	2,5
<b>Melasa</b>	0,7
<b>Kukuřičný šrot</b>	4

Telata od krav ze skupiny A byla po osušení v termoboxu a napojení mlezivem z cucáku umístěna do venkovního individuálního boxu (VIB). Zde bylo telatům podáváno pasterované netržní mléko, ze kterého přešla ve věku 5. dnů na mléčnou náhražku. Telata od krav z druhé skupiny byla do VIB umístěna až den po porodu, poté byla rovněž krmena pasterovaným netržním mlékem a od 5. dne mléčnou náhražkou (Tabulka č. 9) složenou ze sušeného odstředěného mléka, sušené syrovátky, sušené syrovátky částečně delaktosované, syrovátkového permeátu sušeného, rostlinného tuku, vepřového sádla, L-lyzin monohydrochloridu, butylhydroxytoluenu, oxidu zinečnatého, betainu hydrochloridu, uhličitanu železnatého, vit. E, *Enterococcus faecium*, selenomethionin ze *Saccharomyces cerevisiae*, síran měďnatý pentahydrát, vit. C, vit. B1, B2, K3, B6, D3 a jodid draselný. Oběma skupinám byl 5. den věku předložen startér ČOT S Premium od značky Cerea a.s., (Tabulka č. 10).

**Tabulka č. 9** Složení mléčné náhražky

Analytické složky	Množství v [%]
<b>Hrubý protein</b>	23,5
<b>Hrubá vláknina</b>	0
<b>Hrubé oleje a tuky</b>	20
<b>Hrubý popel</b>	8,2
<b>Sodík</b>	0,6
<b>Vápník</b>	1
<b>Fosfor</b>	0,65

**Tabulka č. 10** Analytické složky startéru ČOT S Premium

Analytické složky	Množství v [%]
<b>Hrubý protein</b>	18,5
<b>Hrubá vláknina</b>	4,2
<b>Hrubé oleje a tuky</b>	3,1
<b>Hrubý popel</b>	6,1
<b>Sodík</b>	0,29
<b>Vápník</b>	0,74
<b>Fosfor</b>	0,55
<b>Hořčík</b>	0,4



Složení telecího startéru je pšenice, kukuřice, sójový extrahovaný šrot loupaný, sójový extrahovaný šrot toustovaný, ječmen, slunečnicový extrahovaný šrot, řepkový extrahovaný šrot, len extrudovaný, cukr řepný, CaCO<sub>3</sub>, NaCl, monokalciium fosfát, MgO, Vitamín A, Vitamín D<sub>3</sub>, síran železnatý monohydrát, jodid draselný, síran měďnatý pentahydrát, síran zinečnatý monohydrát, seleničitan sodný.

#### 4.4 Kultivační stanovení bakterií

Pro stanovení bakterií ve vzorcích byla použita kultivační desková metoda. Počty bakterií byly stanovovány na selektivních polotuhých pěstebních médiích. Jednalo se o média Wilkins-Chalgren agar (Oxoid), používaný pro stanovení celkového počtu anaerobních bakterií (CP), dále pro stanovení bifidobakterií (BIF) byl využit modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přidavkem ledová kyselina octová (1ml/l), mupirocin (100 mg/l) a norfloxacinu (200 mg/l). Pro rifampicin rezistentní bifidobakterie (RRBIF), tedy bifidobakterie, který byly podávány kravám před otelením, byl použit rovněž modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s přidavkem rifampicinu (100mg/l), ledové kyseliny octové (1ml/l) a mupirocinu (100 mg/l). Rogosa agar (Oxoid) byl použit pro stanovení laktobacilů (LB). *E. coli* (EC) a koliformní bakterie (KOLI) byly stanoveny na TBX agaru (Oxoid). Veškerá práce byla provedena asepticky (Vlková et al. 2015). Složení vybraných agarů je uvedeno v tabulkách 11, 12 a 13.

Nejprve byla připravena ředící řada. Bujóny pro ředící řady byly připraveny metodou roll-tube, kdy se dané médium probublá oxidem uhličitým k zajištění anaerobního prostředí. Příslušné naředěné vzorky byly umístěny na Petriho misky ve třech opakováních a okamžitě byly zality selektivními půdami. Misky pro kultivaci bifidobakterií a celkových počtů anaerobních bakterií byly přelity vrstvou agaru a ihned byly umístěny do anaerostatu společně s vyvíječem anaerobní atmosféry (Anaerogen, Oxoid). Kultivace laktobacilů probíhala v mikroaerofilním prostředí, které bylo zajištěno dvojí vrstvou agaru. Suspenze bakterií byla přelita první vrstvou agaru a po jejím zatuhnutí byla miska přelita další vrstvou agaru. *E. coli* a koliformní bakterie byly kultivovány aerobně. Ve všech případech probíhala kultivace 48-72 hodin při teplotě 37 °C. Po kultivaci byly kolonie spočítány, byl vypočten průměr a směrodatná odchylka a výsledky vyjádřeny jako log KTJ/g (kolonie tvořící jednotka).

**Tabulka č. 11 – Složení Wilkins-Chalgren bujónu a agaru (Oxoid)**

<b>Wilkins-Chalgren bujón/agar</b>	<b>g/l</b>
<b>Trypton</b>	10
<b>Pepton</b>	10
<b>Glukosa</b>	1
<b>Kvasničný extrakt</b>	5
<b>NaCl</b>	5
<b>L – arginin</b>	1
<b>Na – pyruvát</b>	1
<b>Menadion</b>	0,5
<b>Hemin</b>	5
<b>Agar*</b>	10

\* pouze u Wilkins-Chalgren agaru

Byly porovnány výsledky stanovení jednotlivých skupin bakterií u jednotlivých typů vzorků vždy mezi skupinou A a B. Byl použit studentův t – test, na jehož základě byl určen statisticky významný rozdíl mezi experimentálními skupinami. Statisticky významný rozdíl byl určen na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ,  $\alpha = 0,01$  a  $\alpha = 0,001$ . Pro zpracování výsledků byl využit program Statgraphics Centurion 19.

**Tabulka č. 12 – Složení TBX agaru (Oxoid)**

<b>TBX agar</b>	<b>g/l</b>
<b>Trypton</b>	20
<b>Žlučové soli No.3</b>	1,5
<b>Agar</b>	15
<b>X-glukuronid</b>	0,075
<b>pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C</b>	

**Tabulka č. 13 – Složení Rogosa agaru (Oxoid)**

<b>Rogosa agar</b>	<b>g/l</b>
<b>Trypton</b>	10
<b>Kvasničný extrakt</b>	5
<b>Glukosa</b>	20
<b>Sorbitan monooleát `Tween 80`</b>	1 ml
<b>Dihydrogenfosforečnan draselný</b>	6
<b>Citrát amonný</b>	2
<b>Bezvodý octan sodný</b>	17
<b>Síran hořečnatý</b>	0,575
<b>Síran manganatý</b>	0,12
<b>Síran železnatý</b>	0,034
<b>Agar</b>	20
<b>pH 5.4 ± 0.2 @ 25°C</b>	

## 5 Výsledky

Cílem práce bylo na dvou experimentálních skupinách krav zjistit vliv délky ustájení novorozeného telete společně s matkou na množství bifidobakterií v GIT těchto telat v poporodním období. Byly vytvořeny dvě skupiny dojníc, oběma bylo od pátého dne před plánovaným termínem porodu podáváno mléko prokysané rifampicilinrezistentním kmenem bifidobakterií (RRBIF). Kravám ze skupiny A bylo tele ihned po porodu odebráno, aby nemohlo dojít k žádné interakci s matkou nebo okolním prostředím. Kravám ze skupiny B bylo tele ponecháno po dobu 24h.

Výsledky stanovených počtů bakterií ve vzorcích výkalů a ústní dutiny pokusných telat z obou skupin jsou uvedeny v tabulce č. 14.

**Tabulka č. 14** Počty bakterií stanovené vzorcích výkalů a ústní dutiny pokusných telat (výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka log KTJ/g).

Vzorek	Skupina	CP	BIF	LB	EC	KOLI	RRBIF
výkaly z rekt 2. den po porodu	A	**9,31 ± 0,37	***8,76 ± 0,45	6,61 ± 0,61	7,86 ± 1,08	5,66 ± 2,01	2,73 ± 2,14
	B	**9,66 ± 0,24	***9,34 ± 0,30	7,03 ± 1,58	8,43 ± 0,53	6,11 ± 1,58	3,60 ± 1,38
stěr ze zubů, sliny 2. den po porodu	A	4,87 ± 0,92	2,16 ± 1,94	1,55 ± 1,14	2,17 ± 1,38	*2,77 ± 1,27	1,00 ± 0,00
	B	4,65 ± 0,89	2,51 ± 0,89	1,44 ± 0,86	2,12 ± 1,19	*1,77 ± 1,13	1,05 ± 0,13
výkaly z rekt 5. den po porodu	A	***9,21 ± 0,22	***8,64 ± 0,27	6,65 ± 0,98	7,96 ± 0,86	6,10 ± 2,20	***2,12 ± 0,79
	B	***9,70 ± 0,33	***9,35 ± 0,47	7,44 ± 1,59	7,82 ± 0,53	5,68 ± 2,00	***3,73 ± 1,22
stěr ze zubů, sliny 5. den po porodu	A	*5,11 ± 0,45	2,04 ± 1,11	1,54 ± 1,24	1,73 ± 0,86	*2,54 ± 1,71	1,00 ± 0,00
	B	*4,78 ± 0,40	2,36 ± 1,17	2,00 ± 0,87	1,71 ± 1,04	*1,51 ± 0,82	1,00 ± 0,00

Statisticky významné rozdíly mezi skupinami A a B, \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001

CP – celkový počet anaerobních bakterií; BIF – bifidobakterie; LB – laktobalily; EC – *Escherichia coli*; KOLI – koliformní bakterie; RRBIF – rifampicilin rezistentní bifidobakterie

Při porovnání výsledných dat u obou skupin je patrná vyšší hladina celkových počtů bakterií a to 9,66 ± 0,24 log KTJ/g u skupiny telat, které byla ponechána 24 hodin s matkou, oproti hodnotě 9,31 ± 0,37 log KTJ/g u skupiny telat, která byla ihned po porodu od matek oddělena. Tento rozdíl je statisticky významný (P<0,01). U skupiny telat ustájených 24 hodin s matkami byly zaznamenány i signifikantně vyšší (P<0,001) počty bifidobakterií (9,34 ± 0,30 log KTJ/g) oproti telatům ve skupině A (8,76 ± 0,45 log KTJ/g) (P<0,001) a to ve vzorcích výkalů odebraných 2. den po porodu. Tento rozdíl je rovněž patrný u vzorků výkalů odebraných 5. den po porodu. Ve vzorcích ze slin bylo nalezeno významně (P<0,05) vyšší

koncentrace koliformních bakterií u skupiny A a to jak 2. den  $2,77 \pm 1,27$  log KTJ/g (sk. A) oproti  $1,77 \pm 1,13$  log KTJ/g (sk. B), tak i 5. den po porodu  $2,54 \pm 1,71$  log KTJ/g (sk. A) oproti  $1,51 \pm 0,82$  log KTJ/g (sk. B). Telata ze skupiny A měla také vyšší celkové počty bakterií ve vzorcích slin z 5. dne po porodu. U telat ze skupiny B, která byla ponechána s matkami byla ve všech případech zjištěna vyšší hladina celkových bifidobakterií i uměle dodaných rifampicinrezistentních bifidobakterií, než u telat ze skupiny A. Ve výkalech telat ze skupiny B byla ještě 5. den po porodu zjištěno množství podaných bifidobakterií (RRBIF)  $3,73 \pm 1,22$  log KTJ/g oproti  $2,12 \pm 0,79$  log KTJ/g u skupiny A, tento rozdíl je statisticky významný na hladině významnosti  $P < 0,001$ . Rifampicin rezistentní bifidobakterie ve slinách u skupiny A byly 2. den po porodu pod detekčním limitem ( $1,00 \pm 0,00$  log KTJ/g). U skupiny telat, která byla ponechána 24 hodin s matkami byly ovšem počty RRBIF rovněž velmi nízké a to  $1,05 \pm 0,13$  log KTJ/g. Pátý den po porodu nebyly podané bifidobakterie v ústní dutině detekovány ani u jedné skupiny, zatímco počty přirozeně se vyskytujících bifidobakterií dosahovaly hodnot více než  $10^2$  KTJ/g. Počty laktobacilů ve vzorcích výkalů odebraných z rekta byly vyšší u telat, která byla po porodu ponechána s matkami, jejich počet přesahoval  $10^7$  KTJ/g. U skupiny telat, která byla ihned po porodu odebrána od matek byly hladiny laktobacilů asi o půl řádu nižší. Tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Podobně tomu bylo i ve vzorcích slin, ale tam byly zaznamenány významně nižší počty laktobacilů, ostatně jako i dalších skupin bakterií.

V tabulce č. 15 jsou uvedeny výsledné počty sledovaných bakterií ve vzorcích z dutiny ústní a zubního plaku, vagíny a plodové vody, výkalech z rekta a mléku pokusných dojnic z obou skupin.

**Tabulka č. 15** Počty bakterií stanovené vzorcích výkalů, ústní dutiny a vagíny pokusných dojníc (výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka log KTJ/g).

Vzorek	skupina	CP	BIF	LB	EC	KOLI	RRBIF
výkaly z rekta den porodu	A	*7,70 ± 0,46	5,68 ± 0,70	4,85 ± 1,01	4,70 ± 1,18	3,79 ± 0,84	3,48 ± 1,28
	B	*7,16 ± 0,72	5,92 ± 1,19	4,44 ± 0,39	3,87 ± 1,70	3,60 ± 0,61	2,92 ± 1,12
stěr ze zubů, sliny den porodu	A	5,46 ± 1,04	2,69 ± 1,12	3,87 ± 1,48	***2,25 ± 0,83	2,80 ± 1,13	2,45 ± 1,27
	B	5,51 ± 0,55	2,98 ± 1,50	4,38 ± 1,00	***1,00 ± 0,00	2,21 ± 1,26	2,82 ± 0,89
stěr z vagíny den porodu	A	5,88 ± 0,38	2,92 ± 1,58	2,13 ± 1,27	***3,44 ± 1,38	*2,51 ± 1,37	*1,60 ± 0,73
	B	6,10 ± 1,38	2,83 ± 2,12	2,03 ± 0,89	***1,33 ± 0,49	*1,46 ± 0,72	*1,18 ± 0,31
Mléko 2. den po porodu	A	2,11 ± 0,98	1,25 ± 0,43	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,08 ± 0,18
	B	2,19 ± 0,94	1,40 ± 0,59	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Mléko 5. den po porodu	A	2,59 ± 0,45	1,21 ± 0,49	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	B	2,57 ± 0,51	1,21 ± 0,47	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

Statisticky významné rozdíly mezi skupinami A a B, \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001

CP – celkový počet anaerobních bakterií; BIF – bifidobakterie; LB – laktobalily; EC – *Escherichia coli*; KOLI – koliformní bakterie; RRBIF – rifampicilin rezistentní bifidobakterie

Nevyšší počty bakterií byly dle předpokladu obsaženy ve vzorcích z rekta ( $10^7$  KTJ/g), následovaly vzorky z vagíny a plodové vody ( $10^6$  KTJ/g) a ústní dutiny ( $10^5$  KTJ/g). Ve vzorcích z rekta byl signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) v množství celkových anaerobních bakterií mezi skupinami. Množství celkových anaerobních bakterií ve skupině dojníc oddělených od telat bylo  $7,70 \pm 0,46$  log KTJ/g, ve vzorcích od dojníc, kterým tele zůstalo bylo nalezeno  $7,16 \pm 0,72$  log KTJ/g. Vyjma vzorku z vagíny jsou počty bifidobakterií vyšší, ve všech případech u dojníc ustájených společně s teletem (skupina B). Množství *E. coli* bylo významně ( $P < 0,001$ ) vyšší u dojníc ze skupiny A. V případě vzorků slin, činil rozdíl až 2 řády. Dojnice, které byly od telat separovány měly koncentraci *E. coli* ve slinách  $10^2$  KTJ/g, ale u dojníc, kterým bylo tele ponecháno byla hladina *E. coli* pod hranicí detekčního limitu. Podobně i u vzorků z vagíny byla hladina *E. coli* řádově vyšší, množství u dojníc bez telat bylo stanoveno na  $3,44 \pm 1,38$  log KTJ/g (sk. A), u dojníc s telaty byla koncentrace zjištěna  $1,33 \pm 0,49$  log KTJ/g (sk. B). U vzorků z vagíny a plodové vody dojníc ze skupiny A bylo rovněž zjištěno vyšší množství koliformních bakterií  $2,51 \pm 1,37$  KTJ/g než u skupiny B, kde počty koliformních bakterií dosahovaly hodnot  $1,46 \pm 0,72$  KTJ/g. Rozdíly v počtu koliformních bakterií byly stanoveny na hladině významnosti  $P < 0,05$ . Pokusné bifidobakterie (RRBIF) byly v den porodu prokázány v celém GIT. Byly nalezeny jak v ústní dutině ( $10^2$  KTJ/g), tak v rektu ( $10^3$  KTJ/g). Mezi oběma skupinami nebyly významné rozdíly v četnosti bakterií. Jejich přítomnost byla zjištěna i ve vaginálním sekretu a plodové vodě. Zde byl

stanoven významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) v počtech dodaných bifidobakterií (RRBIF) mezi skupinou dojnic, kterým bylo tele odebráno ( $1,60 \pm 0,73 \log \text{KTJ/g}$ ) a dojnicemi, kterým byla telata ponechána ( $1,18 \pm 0,31 \log \text{KTJ/g}$ ). V mléce byla prokázána pouze velmi nízká hladina  $1,08 \pm 0,18 \log \text{KTJ/g}$  rifampicin rezistentních bifidobakterií u krav ze skupiny A druhý den po porodu a pátý den již nebyly detekovány vůbec. U krav ze skupiny B byla hladina pod detekčním limitem  $1,00 \pm 0,00 \log \text{KTJ/g}$  již druhý den od porodu. Jako další byli v mléce detekovány pouze celkové bifidobakterie a celkové anaerobní bakterie. Mezi jejich počty u jednotlivých skupiny nebyly významné rozdíly. Ostatní skupiny bakterií nebyly v mléce zaznamenány vůbec.

## 6 Diskuse

Starší studie uvádějí, že ke kolonizaci trávicího traktu telat dochází až po porodu (Leahy et al. 2005). V současné době naproti tomu existují studie, které tvrdí, že kolonizace GIT začíná již *in utero* a dochází k ní vertikálním přenosem od matky přes krevní řečiště, a že zdrojem bifidobakterií může být i mléko matky (Wilczyńska et al. 2019). Provedla jsem experiment pro zjištění, zda může být mateřské mléko skotu zdrojem bifidobakterií pro kolonizaci trávicího traktu telat a zda délka společného ustájení telete s matkou ovlivní kolonizaci trávicího traktu bifidobakteriemi.

Dle plánu (Tabulka č. 6) bylo kravám před otelením podáváno fermentované mléko. Původně byl experiment navržen tak, že krávy mléko vypijí rozmíchané ve vlažné vodě, ochucené přidáním Nápoje Porod Plus od výrobce Mikrop Čebín, a.s., který je standartně podáván po otelení všem dojnícím pro prevenci poporodních problémů a bachorových dysfunkcí, popřípadě ho přijmou nalité na krmnou dávku. První dojnice, na které byl pokus prováděn nařaděné mléko ochotně vypila, naproti tomu dojnice z druhé skupiny odmítla nápoj vypít. Nepřijala fermentované mléko ani nalité na krmné dávce, proto musel být experiment upraven a mléko dále podáváno dojnícím přímo do krku. Ačkoli byly krávy ustájeny v kotci, který obsahoval systém samopoutací zábrany, nebylo snadné krávu každý den fixovat a mléko jí podat. Po otelení bylo tele dojnícím ze skupiny A okamžitě odebráno, umístěno do termoboxu a napojeno mlezivem jiné krávy, která RRBIF nebyly podávány. Dojnícím ze sk. B bylo tele ponecháno po dobu 24 hod. po porodu, toto tele pilo mlezivo přímo od matky. Po uplynutí této doby byla telata matkám ze skupiny B také odebrána a umístěna do VIB.

Vzorky z rekta a vagíny jsem získávala přímo v průběhu porodu. Se stěrem z vagíny ani z rekta nebyl problém, provést sterilní odběr slin a stěr ze zubů se mi podařilo až s asistencí dalšího ošetřovatele. Největší objem slin jsem odebrala z jazykových papil, naproti tomu množství zubního plaku bylo minimální, vzhledem k absenci horních předních zubů a aktivní obraně dojnice.

Oproti kontrolní první skupině jsem při odebírání telete pozorovala zvýšenou stresovou zátěž, aktivitu i vokální projevy a samotný odběr byl velmi náročný, protože matky si svá telata bránily, ošetřovatele nechtěly pustit do kotce a útočily na ně. U kontrolní první skupiny, kde byla telata odebrána okamžitě po porodu jsem žádný z uvedených problémů nezaznamenala.

Prvních 5 dní se dle platné legislativy mléko nesmí používat jako tržní, proto na většině farem běžně funguje napájení telat mlezivem od vlastní matky a kontrola kvality mleziva refraktometrem. Výhodou je, že u člověkem řízeného napájení máme přehled o kvalitě a množství přijatého mleziva. V intenzivním chovu není možné ponechávat z výše uvedených důvodů telata s jejich matkami ani po dobu prvních dní, kdy je mléko považováno za netržní.

Další odběry vzorků již probíhaly bez problémů. Odběr fekálií jsem provedla sterilní rukavicí přímo z rekta, ústní a vaginální stěry lékařskými lopatkami. Mléko bylo odstříknuto přímo do zkumavek.

Ačkoli byla původně velikost skupina A i B stejná došlo při 5. a 6. kole experimentu k onemocnění telat ze skupiny A. Tele č. 9 dostalo průjmové onemocnění a ve věku 3 dnů mu muselo být podáno antibiotikum Norocillin. Po antibiotické léčbě by nutně došlo k ovlivnění výsledků. Proto odběr ve věku 5 dní již nebyl uskutečněn a tele i se svou matkou vyřazeny



z pokusu. Tele č. 11 onemocnělo pneumonií a bylo léčeno postupně několika druhy antibiotických přípravků. I přes veškerou podpůrnou terapii a péči ošetřovatelů toto tele ve věku 10 dní uhynulo. Proto byla i tato dvojice vyřazena z experimentu.

Z výsledků vyplývá, že počty bifidobakterií v mléce se pohybují do  $10^2$  KTJ/g, což jsou počty velmi nízké, nicméně nelze vyloučit, že mléko matky může být zdrojem bifidobakterií pro kolonizaci trávicího traktu telat. Na druhou stranu, bifidobakterie z ústní dutiny telete mohou infikovat vemeno a strukový kanálek matky, při zpětném toku mléka při sání a následně pak mohou být tyto bakterie detekovány v mléce. Bifidobakterie však byly přítomny i v mléce krav, které byly ihned po porodu odděleny od telat, u kterých k takovému zpětnému přenosu dojít nemohlo. Pro potvrzení hypotézy, že mléko může být zdrojem bifidobakterií pro mládě musí být provedeny další studie, při kterých je nutné mléko asepticky odebráno přímo z mléčné žlázy. Vemeno a strukový kanálek, potažmo mléko, totiž může být kontaminováno výkaly samotné dojnice. Ani při maximální snaze a dezinfekci vemene před odběrem mléka k analýzám není možné kontaminaci z prostředí zabránit.

Kolonizace střeva je komplikovaný proces, který je závislý na řadě faktorů, mezi které patří délka březosti, zdravotní stav matky, věk, antibiotická léčba, délka a způsob porodu a typ výživy (Alipour et al. 2018; Dogra et al. 2015). K nejvýznamnější změně ve složení střevní mikrobioty dochází v prvních týdnech života. Bifidobakterie jsou převládající skupinou bakterií ve střevě mláďat krmených mateřským mlékem, která se narodila vaginální cestou (Wilczyńska et al. 2019). Bohužel zatím nebyly provedeny studie, které by podrobně zkoumaly vliv kojení a způsobu porodu na kolonizaci GIT skotu. Nicméně existují studie, které se podobnou problematikou zabývají u lidí (Rada et al. 2011) nebo jiných živočišných druhů (Ardesir et al. 2014). Budeme předpokládat, že mechanismy přenosu bifidobakterií z matky na mládě mohou být podobné a diskutovat výsledky se studiemi provedenými na lidech či jiných živočišných druzích.

Značný vliv na kolonizaci GIT má způsob porodu. Musilová et al. (2015) ve své studii zjistili rozdíly v kolonizaci střeva novorozenců narozených vaginálně a císařským řezem. Ze studie vyplývá, že ve střevech kojenců narozených vaginálně tvoří bifidobakterie dominantní složku až v 86,89 % případů. Naproti tomu u kojenců narozených císařským řezem tvoří dominantní složku pouze v 41,03 %. Ve zbývajících 58,97 % případů nebyly bifidobakterie ve stolici vůbec detekovány, zde byly relativně dominantní bakterie *E. coli*, klostridie a gramnegativní anaeroby.

Všechna telata, která byla zařazena do experimentu se narodila vaginální cestou, i tak výsledky podporují tezi, že je velmi pravděpodobná kolonizace v průběhu porodu, při průchodu porodními cestami. Referenčně označené bifidobakterie (RRBIF) byly přítomny v okamžiku porodu na vaginální sliznici, ve vaginálním sekretu i plodové vodě. Nelze vyloučit ani kolonizaci již *in utero*, protože plodová voda matky obsahovala významnou hladinu testovaných bakterií (RRBIF). I telata, která byla od matek okamžitě oddělena a jejich mlezivo nedostala byla kolonizována rifampicin rezistentním kmenem bifidobakterií. Toto zjištění podporuje výsledek výše uvedené studie. I část kojenců, kteří se narodili za pomoci císařského řezu byla kolonizována bifidobakteriemi, nicméně ve výrazně menší míře než kojenci, kteří se narodili vaginálně. Zcela jistě tak můžeme potvrdit vertikální přenos bifidobakterií přes pohlavní orgány matky. Ale je pravděpodobné, že k nejmasivnějšímu přenosu bifidobakterií dochází až při průchodu vnějším pohlavním orgánem.

Zejména u hospodářských zvířat může být vulva kontaminována bakteriemi z rekta. Bifidobakterie tvoří podstatnou část fekální mikrobioty, v našem experimentu dosahovaly hodnot  $10^5$  až  $10^6$  KTJ/g. Při kontaminaci pohlavních orgánů, však může docházet k přenosu i méně pozitivních druhů mikrobioty, jako např. koliformních bakterií nebo *E. coli*. K tomuto přenosu pravděpodobně došlo v průběhu porodu u krav ze skupiny A, kterým bylo tele ihned po porodu odebráno. Koliformní bakterie byly detekovány v množství  $2,51 \pm 1,37$  log KTJ/g a *E. coli* v množství  $3,44 \pm 1,38$  log KTJ/g. V obou případech tvoří naměřené množství signifikantní rozdíl proti druhé sledované skupině. Můžeme se proto domnívat, že u dojnic ve skupině A byly vnější pohlavní orgány při porodu kontaminovány výkaly z rekta. V prostředí chléva, kde standartně k porodům dochází nelze dodržovat přísnou puerperální hygienu a ke kontaminacím běžně dochází. Krávy si však zřejmě vytvořily účinný mechanismus k potlačení rozvoje nežádoucí mikrobioty u novorozenečků telat. Ve skupině telat, která byla ustájena společně s matkou byla druhý den po porodu naměřena vyšší koncentrace jak koliformních bakterií, tak *E. coli*. Při společném ustájení dochází ke kolonizaci mláďete mikrobiotou okolního prostředí, ve kterém převládá fekální mikrobiota matky. Je u nich tedy přirozeně vyšší hladina koliformních bakterií než u telat ustájených separátně, která byla kolonizována pouze při průchodu vnějšími pohlavními orgány, jak je popsáno výše. Situace se ovšem v čase mění a 5. den po porodu je již koncentrace *E. coli* a koliformních bakterií u telat ustájených s matkou nižší než u telat ustájených separátně. Hladina bifidobakterií (a to jak dodaných RRBF, tak celkových) byla od začátku ve všech případech vyšší u telat s matkou a mezi 2. a 5. poporodním dnem došlo k dalšímu nárůstu počtu bifidobakterií a laktobacilů. U separovaných telat naopak došlo k mírnému nárůstu koliformních bakterií. Můžeme se proto domnívat, že s vyšší mikrobiální kolonizací fakultativně anaerobními koliformy v počátku života se telata ze skupiny B vyrovnala právě díky rozvoji pozitivní probiotické mikrobioty, která potlačila jejich růst.

K rozvoji probiotické mikrobioty přispívá výraznou měrou konzumace mateřského mléka. Rozdíly ve složení střevní mikrobioty u kojených dětí a dětí krmených umělým mlékem se zabýval Rubaltelli et al. (2009). Vytvořil 2 skupiny 4 dny starých novorozenců, 22 dětí bylo kojených a 20 krmených umělým mlékem. U skupiny kojených dětí tvořily bifidobakterie dominantní složku mikrobioty (47,6 % ku 15 % u dětí na umělé výživě) a v průměrném počtu bakterií ve stolici ( $7,1 \pm 0,8$  KTJ/g ku  $5,3 \pm 0,6$  KTJ/g u dětí na umělém mléce). U novorozenců krmených umělou výživou tvořily dominantní složku mikrobioty enterokoky (průměrné počty  $6,7 \pm 0,9$  KTJ/g u kojených ku  $7,4 \pm 0,5$  KTJ/g).

Dalšími autory, kteří se zabývali vlivem kojení a umělé výživy na zdravotní stav novorozenců jsou Ardesir et al. (2014). Ve své studii zkoumali vliv kojení a umělé výživy na imunitní systém makaka rhesus a došli k závěru, že imunitní systémy obou skupin se vyvíjejí značně odlišně a tyto odlišnosti přetrvávají až 6 měsíců po odstavení. U mláďat kojených mateřským mlékem došlo k vytvoření masivní populace T-lymfocytů a pomocných TH17 lymfocytů jako obranné složky specifického imunitního systému. U mláďat krmených mléčnou náhražkou tyto složky imunitního systému rozvinuty nebyly. Tato zjištění mohou částečně vysvětlit rozdíly v ochraně proti určitým infekčním chorobám.

Obsahem bifidobakterií v mateřském mléce se zabývá řada dalších studií. Mezi ně patří studie Rady et al. (2011), ve které byly porovnávány 2 skupiny žen a jejich dětí. V první skupině bylo 18 žen a dětí v jejichž stolici byly nalezeny bifidobakterie. Ve druhé bylo 43 žen

a dětí jejichž stolice bifidobakterie neobsahovala. Bylo otestováno mléko žen na přítomnost bifidobakterií pomocí F6PPK testu. U první skupiny obsahovalo mléko bifidobakterie v 35 % případech. Ve druhé skupině, kde stolice kojenců bifidobakterie neobsahovala, nebyly bifidobakterie nalezeny ani v jednom vzorku mléka. Tato studie se proto přiklání k možnosti kontaminace mléka při zpětném toku do kanálku v průběhu kojení.

Toto zjištění nekoresponduje s výsledky našeho experimentu, kde byly bifidobakterie nalezeny u obou skupin dojnic. Nicméně musíme zvážit i možnost zkreslení z důvodu kontaminace mléčné žlázy fekální mikrobiotou, která je u skotu vysoce pravděpodobná a u lidí v podstatě vyloučená. Nalezené množství jak mutantního kmenu RRBIF, tak i celkových bifidobakterií v mléce obou skupin bylo srovnatelné. I mléko dojnic, kterým bylo tele okamžitě odebráno a zpětný přenos lze tedy vyloučit dosahovalo hodnot  $1,25 \pm 0,43 \log$  KTJ/g druhý den po porodu, resp.  $1,21 \pm 0,49 \log$  KTJ/g pátý den po porodu. Obsah bifidobakterií v mlezivu nebyl předmětem zkoumání, proto nelze jejich zvýšenou hladinu potvrdit, ale telata, která toto mlezivo a následně mléko přijímala, měla hladinu RRBIF i celkových bifidobakterií vyšší. Proto můžeme usuzovat, že i mléko je podstatným zdrojem bifidobakteriálního osídlení.

Z výše uvedených studií a provedeného experimentu vyplývá, že mezi faktory ovlivňující kolonizaci mláďat bifidobakteriemi patří způsob porodu, způsob výživy (kojení nebo mléčná náhražka), okolní prostředí a další. Proto můžeme potvrdit hypotézu, že délka ustájení telete společně s matkou má na kolonizaci trávicího traktu vliv. Všechny uvedené faktory, jsou v přímé závislosti na matce a výsledky experimentu ukázaly signifikantní rozdíly mezi testovanými skupinami.

## 7 Závěr

- Po vyhodnocení získaných dat můžeme potvrdit statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami. Telata, která zůstala ustájená společně s matkou 24h po porodu, vykazovala vyšší hladiny rifampicin rezistentního kmene bifidobakterií (RRBIF) než telata, která byla od matek okamžitě separována.
- Mléko je pravděpodobně zdrojem bifidobakterií, protože telata, která sála mateřské mléko byla ve všech případech více kolonizována probiotickými bakteriemi.
- Při společném ustájení telete s matkou bylo v mikrobiotě telat detekováno významně vyšší množství probiotických bakterií a nižší hladina fakultativně anaerobních koliformních bakterií.
- Byla potvrzena hypotéza, že délka společného ustájení mláděte s matkou má vliv na kolonizaci GIT novorozených telat.

## 8 Literatura

- Alawneh JI, Barreto MO, Moore RJ, et al. 2020. Systematic review of an intervention: the use of probiotics to improve health and productivity of calves. *Preventive Veterinary Medicine* **183**:105147
- Alipour MJ, Jalanka J, Pessa-Morikawa T, Kokkonen T, Satokari R, Hynönen U, Iivanainen A, Niku M. 2018. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Scientific Reports* **8**(1):10437
- Ardeshir A, Narayan NR, Méndez-Lagares G, Lu D, Rauch M, Huang Y, et al. 2014. Breast-fed and bottle-fed infant rhesus macaques develop distinct gut microbiotas and immune systems. *Science Translational Medicine* **6**(252):252ra120.
- Bach ÁA, Ahedo J, Ferrer A. 2010. Optimizing weaning strategies of dairy replacement calves. *Journal of Dairy Science* **93**(1):413-419
- Bach ÁA. 2018. Výživa a dobré podmínky v chovu skotu. Tradiční odborné setkání chovatelů skotu. 13. února 2018. Větrný Jeníkov
- Beam AL, Lombard JE, Koprál CA, Garber LP, Winter AL, Hicks JA, Chlatter JL. 2009. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* **92**:3973-3980
- Biavati B, Mattarelli P. 2012. Genus *Bifidobacterium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Five The Actinobacteria, Part A, 2nd Edition*. Springer. London
- Bunešová V, Domig KJ, Killer J, Vlková E, Kopečný J, Mrázek J, Ročková Š, Rada V. 2012. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* **18**(1):166-168
- Bunešová V, Vlková E, Geigerová M, Rada V. 2015. Effect of rearing systems and diets composition on the survival of probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves. *Livestock Science* **178**: 317–321.
- Carlson BM. 2013. *Human Embryology and Developmental Biology* 5th Ed. Elsevier Books. Philadelphia
- Cortese VS. 2009. Neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practise* **25**(1):221-227

- Cronin M, Ventura M, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**:4-18
- De Preter V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K. 2011. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? *Molecular Nutrition & Food Research* **55**:46-57
- Dogra S, Sakwinska O, Soh SE, Ngom-Bru C, Brück WM, Berger B, Brüssow H, Lee YS, Yap F, Chong YS, Godfrey MK, Holbrook JD. 2015. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *ASM Journals. mBio* **6**(1):6
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp.nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of System Evolution Microbiology* **50**(1):119-125
- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. 2006. *The prokaryotes*. New York: Springer
- Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* **141**:S15-S28
- Geigerová M, Vlková E, Skřivanová E, Bunešová V. 2014. Odlišnosti v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců. *Veterinářství* **64**:522–526
- Guzzardi MA, Ait Ali L, D'Aurizio R, Rizzo F, Saggés P, Sanguinetti E, Weisz A, Pellegrini M, Iozzo P. 2019. Fetal cardiac growth is associated with in utero gut colonization. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **29**(2):170-176
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **11**:506–514
- Hofírek B, Dvořák R, Němeček L, Doležal R, Pospíšil Z, et al. 2009. *Nemoci skotu*. Česká buriatrická společnost. Noviko a.s.. Brno
- König HE, Liebich HG. 2002. *Anatomie domácích savců 2*. Hajko a Hajková. Bratislava

- Leahy SC, Higging DG, Fitzgerald GF, Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **98**(6):1303-1315
- Lugli GA, Milani C, Turrone F, et al. 2017. Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC Genomics* **18**:568
- Malmuthuge N, Liang G, Griebel PJ, Guan LL. 2019. Taxonomic and functional composition of the small intestinal microbiome in neonatal calves provide a framework for understanding early life gut health. *Applied and Environmental Microbiology* **85**(6). DOI: 10.1128/AEM.02534-18
- Manning TS, Gibson GR, Link-Amster H. 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* **18**:287-298
- Marvan F, et al. 2003. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita. Praha
- Musilová S, Rada V, Vlková E, Bunešová V, Nevorál J. 2015. Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica* **104**(4):184–186.
- National Animal Health Monitoring System - NAHMS 2007
- Paliy AP, Gujvinska SO, oLivshchenko LP, Nalivayko LI, Livoshchenko YM, Risovaniy VI, Dubin RA, Berezhna NV, Pali AP, Petrov RV. 2020. Specific composition of indigenous microflora (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp.) in farm animals. *Ukrainian Journal of Ecology* **10**(1):43-48
- Pardon B, Hostens M, Duchateau L, Dewulf J, De Bleecker K, Deprez P. 2013. Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. *BMC Veterinary Research* **9**(79)
- Phillips C. 2002. Cattle behavior and welfare. 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell Science Ltd. Oxford
- Qiang X, YongLie C, QianBing W. 2009. Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* **77**:435-441
- Rada V, Nevorál J, Flajšmanová K, Ročková Š, Krčmářová I, Grmanová M, Vlková E, Nováková I, Killer J, Kopečný J. 2011. Occurrence of bifidobacteria in human milk, *Milchwissenschaft* **66**(2):123-126

- Renaud DL, Kelton DF, Weese JS, Noble C, Duffield TF. 2019. Evaluation of a multispecies probiotic as a supportive treatment for diarrhea in dairy calves: A randomized clinical trial. *Journal of Dairy Science* **102**(5): 4498-4505
- Rubaltelli FF, Biadaoli R, Pecile P, Nicoletti P. 2009. *Journal of Perinatal Medicine* **26**(3):186-191
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**(1):88-105
- Salfinger M. 1980. Möglichkeiten und Grenzen des kulturellen Nachweises eines bakteriellen Darminfekttest. *Therapeut Umschau* **37**:181-186
- Sánchez B, Ruiz L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P, Margolles A. 2012. Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends in Food Science* **26**(1):56-63
- Shaw HJ, Innes EA, Morrison LJ, Katzer F, Wells B. 2020. Long-term production effects of clinical cryptosporidiosis in neonatal calves. *International Journal for Parasitology* **50**(5):371-376
- Simon GL, Gorbach SL. 1984. Intestinal Flora in Health and Disease. *Gastroenterology* **86**:174-193
- Skřivánek M, 2001. Procesy trávení v předžaludcích – morfologické a fyziologické aspekty. *Farmář* **10**:56–57
- Stefańska B, Sroka J, Katzer F, Goliński P, Nowak Z. 2021. The effect of probiotics, phytobiotics and their combination as feed additives in the diet of dairy calves on performance, rumen fermentation and blood metabolites during the preweaning period. *Animal Feed Science and Technology* **272**:114738
- Sumner CL, von Keyserlingk MAG. 2018. Canadian dairy cattle veterinarian perspectives on calf welfare. *Journal of Dairy Science* **101**(11):10303-10316
- Úřední věstník Evropské unie 2003
- Valdez RMA, dos Santos VR, Caiiffa KS, Danelon M, Arthur RA, de Cássia Negrini T, Delbem ACB, Duque C. 2016. Comparative in vitro investigation of the cariogenic potential of bifidobacteria. *Archives of Oral Biology* **71**:97-103



- Venema K, do Carmo AP. 2015. Probiotics and Prebiotics: Current research a future trends. Beneficial Microbes Consultancy. Wageningen
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**:205–23.
- Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, Moreno-Munoz JA, Fitzgerald GF, Sinderen D. 2007. From bacterial genome to functionality; case bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **120**(1-2):2-12
- Vlková E, Trojanová I, Rada V. 2006. Distribution of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiologica* **51**(4):325–328
- Vlková E, Rada V, Trojanová I, Killer J, Šmehilová M, Molatová Z. 2008. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Archives of Animal Nutrition* **62**(5):359-365
- Wallace RJ & Newbold CJ. 1992. Probiotics for ruminants. Probiotics The scientific basis. Chapman & Hall. London. 317–353
- Wilczyńska P, Skarzyńska E, Lisowska-Myjak B. 2019. Meconium microbiome as a new source of information about long-term health and disease: questions and answers. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **32**(4):681-686
- Wilson M. 2008. Bacteriology of humans: an ecological perspective. Blackwell Pub. Malden. 360s. ISBN: 9781405161657

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- GIT – gastrointestinální trakt
- SCFA – short chain fat acid – těkavé mastné kyseliny
- VIB – venkovní individuální boxy
- VSB – venkovní skupinové boxy
- KTJ – kolonie tvořící jednotka
- ČOT – časný odstav telat
- WHO – World Health Organization – Světová zdravotnická organizace
- FAO – Food and Agriculture Organization – Organizace pro výživu a zemědělství
- NAHMS – National Animal Health Monitoring System
- F6PPK – fruktóza-6-fosfátfosfoketoláza
- FOS – fruktooligosacharidy
- GOS – galaktooligosacharidy
- SOS – sojové oligosacharidy
- MOS – mannanoligosacharidy
- CP – celkový počet anaerobních bakterií
- BIF – bifidobakterie
- LB – laktobalily
- EC – *Escherichia coli*
- KOLI – koliformní bakterie
- RRBIF – rifampicilin rezistentní bifidobakterie