

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Stanovení probiotik v krmivech pro kočky

Diplomová práce

Anna Tučková

Výživa a dietetika zvířat

Ing. Roman Švejtil, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení probiotik v krmivech pro kočky" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Romanu Švejstilovi, Ph.D. za pomoc, odborné rady a čas, který mé práci věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tereze Kodešové a Ing. Nikol Modráčkové za pomoc při výzkumu v laboratořích.

V neposlední řadě chci poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

Stanovení probiotik v krmivech pro kočky

Souhrn

Teoretická část této práce je zaměřena na znalosti o gastrointestinálním traktu a trávicích procesech kočky. Jsou shrnuty základní nutriční potřeby kočky, stručně popsána probiotika, jejich výběrová kritéria, obecné účinky a jejich použití u vybraných hospodářských a domácích zvířat.

Cílem práce bylo stanovení probiotických mikroorganismů ve vybraných krmivech pro kočky. Mikroorganismy byly stanovovány za pomoci kultivačních metod. K ověření jejich identity byla použita metoda MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Celkem bylo testováno šest vzorků komerčních granulovaných krmiv a jeden krmný doplněk – pasta. Nejvíce probiotických mikroorganismů bylo detekováno v pastě, která splňovala počty deklarované výrobcem. Vzorky granulovaných krmiv byly podrobeny testování v závislosti na době skladování od otevření do doby provedení pokusu. Krmiva, která byla skladována až několik týdnů při pokojové teplotě neobsahovala takřka žádné z deklarovaných probiotik. Počet živých mikroorganismů se v krmivech týden po otevření mírně, ale statisticky významně snížil ($P < 0,05$). Množství stanovených probiotických mikroorganismů u všech krmiv bylo nižší než množství deklarované výrobcem.

Hypotéza, že obsah stanovených probiotických mikroorganismů v krmivech pro kočky bude vyšší, než obsah deklarovaný výrobcem a bude tak splňovat požadavky na kvalitu krmiva, byla v této práci vyvrácena. Testovaná krmiva obsahovala nižší počty mikroorganismů, než na nich bylo deklarováno výrobcem.

Klíčová slova: probiotika, kočka, krmení, enterokoky, laktobacily

Assessment of probiotics in feedstuffs for cats

Summary

The theoretical part of this diploma thesis reviews the gastrointestinal tract and digestive processes of cats. The basic nutritional needs of cat are summarized, probiotics are briefly described, as well as their selection criteria, general effects and their use in selected farm and domestic animals.

The aim of the thesis was to determine probiotic microorganisms in selected cat feeds. Microorganisms were determined using culture methods. The MALDI-TOF mass spectrometry was used to verify their identity.

A total of six samples of commercial granulated feeds and one feed supplement - paste - were tested. The highest count of probiotic microorganisms was detected in the paste, which met the numbers declared by the producer. Samples of granulated feed were tested depending on the storage time from opening to the time of the experiment. Feed that was stored for up to several weeks at room temperature contained almost none of the declared probiotics. The number of live microorganisms in the feed decreased slightly but statistically significantly one week after opening ($P < 0.05$). The amount of probiotic micro-organisms determined in all feedstuffs was lower than the amount declared by the producer.

The hypothesis that the content of specified probiotic microorganisms in cat food will be higher than the content declared by the producer and will thus meet the requirements for feed quality was refused in this thesis. The tested feeds contained lower counts of microorganisms than declared by the producer.

Keywords: probiotics, cat, feeding, enterococcus, lactobacillus

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Trávicí soustava a trávení kočky	10
3.2 Mikrobiota žaludku a střev	12
3.3 Výživa a základní nutriční potřeby kočky.....	13
3.4 Vliv výživy na mikrobiotu kočky	19
3.5 Probiotika	19
3.5.1 Historie a definice.....	19
3.5.2 Výběrová kritéria a bezpečnost probiotik.....	20
3.5.3 Obecné účinky probiotik.....	21
Mikroorganismy používané jako probiotika v krmivech.....	22
3.5.4 Probiotika pro hospodářská zvířata	23
3.5.4.1 Přežvýkavci	23
3.5.4.2 Prasata	24
3.5.4.3 Drůbež	25
3.5.4.4 Koně	26
3.5.5 Probiotika pro domácí zvířata.....	26
3.5.5.1 Psi	26
3.5.5.2 Kočky	27
3.5.6 Charakteristika nejpoužívanějších rodů.....	27
3.5.6.1 Enterococcus	27
3.5.6.2 Lactobacillus	27
3.5.6.3 Bifidobacterium.....	28
4 Metodika	29
4.1 Testované vzorky.....	29
4.2 Postup mikrobiologického rozboru	30
4.2.1 Použitá kultivační media a jejich příprava.....	30
4.2.2 Příprava vzorků.....	32
4.2.3 Příprava ředících řad.....	34
4.2.4 Izolace a kultivace vzorků	35
4.2.5 Vyhodnocení a identifikace bakterií	35
5 Výsledky.....	37
1. pokus	37

2. a 3. pokus (čerstvé a týden po otevření)	37
6 Diskuze	40
7 Závěr	43
8 Literatura	44

1 Úvod

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které v určitém množství působí pozitivně na trávicí trakt a imunitní systém hostitele. V současné době jsou čím dál oblíbenější a používají se jak ve výživě lidí, tak ve výživě hospodářských i domácích zvířat.

Stejně jako u lidí a jiných zvířat, jsou tyto mikroorganismy přirozenou součástí střevní mikrobioty koček. Jakákoliv nerovnováha či poškození střevní mikrobioty může způsobit řadu onemocnění a poruch metabolismu. Na složení střevní mikrobioty má vliv výživa, věk a celkový zdravotní stav kočky. Na podporu a udržení rovnováhy střevních mikroorganismů jsou podávána právě probiotika. Účinků probiotik je celá řada, mezi ně patří například vytěsňování patogenů, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, antimikrobiálních látek a některých vitamínů.

Kočkám jsou probiotika přidávána do suchých granulovaných krmiv, konzerv nebo se prodávají ve formě krmných doplňků. Při výběru probiotik je klíčové dbát na jejich bezpečnost a účinnost potvrzenou pro daný druh zvířete. Je důležité, aby probiotické mikroorganismy byly životaschopné a byly dodány v dostatečném množství. Mezi nejčastěji používané probiotické mikroorganismy patří rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus*.

Na trhu existuje spousta komerčních výrobků obsahujících probiotické mikroorganismy. Výrobci krmiv a krmných doplňků deklarují obsah a počet těchto mikroorganismů na etiketách, avšak neexistují žádné legislativní předpisy týkající se přidávání těchto mikroorganismů do potravin či krmiv.

Existuje spousta metod, díky kterým lze identifikovat a stanovit počty probiotických bakterií v krmivech. Jednou z nejčastějších jsou kultivační metody, které jsou vhodné pro stanovení počtu narostlých kolonií a určení identifikace mikroorganismu na úroveň rodu.

Tato práce je zaměřena na stanovení probiotik v krmivech pro kočky a porovnání s množstvím mikroorganismů uvedeným na etiketě.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je stanovit probiotické mikroorganismy ve vybraných krmivech pro kočky a porovnat jejich množství s údaji od výrobce.

Hypotézou je, že počty stanovených bakterií budou přesahovat množství uvedená výrobcem, a tím splňovat požadavky na kvalitu krmiva.

3 Literární rešerše

3.1 Trávicí soustava a trávení kočky

Trávicí ústrojí kočky se skládá z orgánů, které slouží k přijímání, mechanickému a chemickému zpracování a vstřebávání důležitých složek potravy. Zároveň umožňuje vylučování nevstřebaných a nežádoucích zbytků potravy z těla ven. Trávicí soustavu kočky tvoří ústní dutina, hltan, jednoduchý žaludek, tenké, tlusté a slepé střevo (Reece 2011). Kočky mají v porovnání s býložravci chrup přizpůsobený k lovení a rozkousání kořisti, relativně krátké střevo a složení žaludečních kyselin určené k rozkládání bílkovin (Hüsemann, 2010). Trávicí soustava začíná ústní dutinou, jejíž součástí je jazyk, zuby a žlázy, které produkují sliny (Červený 2011)

Jazyk je svalový orgán uložený v dutině ústní. Na jazyku rozlišujeme hrot, tělo a kořen. Součástí povrchu jazyka jsou mechanické a chuťové papily. Mechanické papily slouží ke zpracování potravy a patří mezi ně papily nitkovité, kuželovité a papily, které se nachází na okraji jazyka a mají význam pouze u kořat sajících mateřské mléko. Mezi chuťové papily patří houbovitě, hrazené a lístkovité papily (Červený 2011). Součástí chuťových papil jsou chuťové pohárky, které reagují na chuťové podněty, a hrají tak velkou roli při procesu trávení (Reece 2011). Na konci každého chuťového pohárku jsou umístěny chuťové receptory. Rozlišujeme receptory sladké, kyselé, slané, hořké a umami. Obecně jsou kočky vysoce citlivé na chuť aminokyselin a na různé typy organických kyselin a nukleotidů, což jsou látky hojně se vyskytující ve zvířecích tkáních (Case et al. 2011). Co se týče sladké chuti, kočkám chybí jeden ze dvou receptorových genů, o nichž je známo, že kódují receptory sladké chuti. Tento defekt je odpovědný za nízkou citlivost na sladkou chuť (Mínguez 2017). Místo těchto receptorů mají kočky receptor vysoce citlivý na chinin, trísloviny a alkaloidy – příchutě, které jsou považovány za hořké (Case et al. 2011).

Pomocí zubů dochází k mechanickému narušení potravy (Reece 2011). Kočky jsou masožravci a jejich chrup je k jejich způsobu života dokonale přizpůsoben. Čelist je uzpůsobena pouze k trhání a řezání potravy, a proto kočky polykají větší sousta, někdy i celou kořist. Chrup je tvořen 30 zuby, které kočkám slouží k ulovení a zabití kořisti (Laukner 2007). Rozlišujeme čtyři druhy: řezáky, špičáky, zuby třenové a stoličky (Reece 2011). Přední drobné řezáky slouží k uchopení potravy či kořisti (Laukner 2007). Horní špičáky jsou poměrně dlouhé a ostré. Na rozdíl od psů, obsahuje čelist kočky méně zubů třenových a stoliček a mají velmi omezenou funkci. To je dáno tím, že tyto zuby jsou spojeny se žvýkáním a rozdrčením potravy, která obsahuje více rostlinné složky. Chrup kočky je tak typickým vzorcem pozorovaným u většiny masožravců (Case et al. 2011). Zubní vzorec trvalého chrupu kočky je u horní čelisti 3I 1C 3P 1M a u dolní čelisti 3I 1C 2P 1M (Červený 2011).

V ústech se nacházejí exokrinní žlázy vylučující sekret – sliny (Červený 2011). Sliny jsou vylučovány v reakci na pohled a vůni potravy (Case et al. 2011). Na rozdíl od přežvýkavců a všežravců, kočičí sliny neobsahují enzym ptyalin, který štěpí škrob již v dutině ústní (Laukner 2007). Sliny tedy pouze „promazávají“ a změkčují potravu, vytváří z ní shluky, které jsou dále poháněny do hltanu (Agar 2001).

Hltan je trubicovitý orgán, ze kterého vedou otvory do ústní dutiny, do nosních dutin, Eustachových trubic, hrtanu a jícnu (Hudson & Hamilton 2010). Hltan zabraňuje vstupu sousta do hrtanu a nosních dutin. Na hltan navazuje jícen, který spojuje hltan se žaludkem.

Jícen je svalová trubice, jejíž funkcí je transport vody a potravy (Reece 2011). Potrava je posunována peristaltickými vlnami, které vznikají v důsledku činnosti jeho svaloviny, až k žaludku (Case et al. 2011).

V žaludku dochází k chemickému trávení bílkovin, míchání potravy se žaludeční sekrecí a regulaci vstupu potravy do tenkého střeva (Case et al. 2011). Kočky mají jednoduchý, jednodukomorový žaludek, který je tvořen jedním vakem vystlaným pouze žláznatou sliznicí (Červený 2011). Součástí této sliznice jsou různé typy žláz, jejichž buňky produkují hlen, pepsinogen, kyselinu chlorovodíkovou a hormon gastrin (Reece 2011). Kočičí žaludek produkuje oproti lidskému žaludku velmi silnou žaludeční kyselinu, před kterou je žaludek chráněn hlenem. Díky nízkému pH této kyseliny se kočičí žaludek dokáže vypořádat například se syrovými kostmi a masem (Laukner 2007). Průměrné pH obsahu žaludku kočky je 2,5 (Case et al. 2011). Kyselina chlorovodíková a enzym pepsinogen jsou zodpovědné za zahájení trávení bílkovin. Pepsinogen je díky kyselině chlorovodíkové přeměněn na aktivní pepsin, který iniciuje hydrolyzu proteinových molekul a tím zahajuje trávení bílkovin v žaludku (Reece 2011). Aktivita pepsinu je nejvyšší v kyselém prostředí v žaludku. Ke snížení aktivity dochází, jakmile je vystaveno neutrálnímu pH tenkého střeva. Pro sekreci HCl a hlenu jsou důležité neurologické a hormonální podněty. Neurologické podněty vznikají v reakci na očekávání příjmu krmiva, na pohled nebo vůni potravy a na přítomnost potravy v žaludku. Hormon gastrin je uvolňován v reakci na přítomnost potravy v žaludku a nejen, že stimuluje sekreci HCl a hlenu, ale také zvyšuje žaludeční motilitu. Mezi další podněty, které ovlivňují žaludeční sekreci a celkové trávení kočky, patří podněty psychologické, například stres, strach a úzkost (Case et al. 2011).

Částečně natrávená a mechanicky zpracovaná potrava, tzv. chymus, vstupuje ze žaludku do tenkého střeva. V této části trávicí soustavy dochází k chemickému zpracování potravy a vstřebávání živin z potravy. Tenké střevo je složeno ze tří částí: dvanáctník (*duodenum*), lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*) (Reece 2011). Na dvanáctník se napojuje vývod slinivky břišní, jejíž šťáva obsahuje enzymy, které se významně podílejí na trávení v tenkém střevě (Laukner 2007). Další a nejdélší částí tenkého střeva je lačník, který tvoří nejdůležitější úsek z hlediska trávení a absorpce potravy. Na lačník navazuje krátký kyčelník (Červený 2011). Celému trávení v tenkém střevě přispívají také střevní klky vystupující z epitelových buněk sliznice střeva, které zaručují optimální přijímání živin (Laukner 2007). Ve dvanáctníku se nacházejí Brunnerovy žlázy, které vylučují hlen. Tento hlen chrání střevní sliznici před podrážděním žaludečními kyselinami, které spolu s potravou vstupují ze žaludku. Ze sliznice střeva jsou vylučovány enzymy, které tráví tuky, sacharidy a bílkoviny. Mezi tyto enzymy patří střevní lipáza, aminopeptidáza, dipeptidáza, nukleotidáza, nukleosidáza a enterokináza. Dále se do střeva uvolňují enzymy pankreatické šťávy ze slinivky břišní. Mezi enzymy vylučované slinivkou břišní patří trypsin, chymotrypsin, karboxypeptidáza a nukleáza. Některé z nich jsou sekretovány v neaktivní formě a jsou aktivovány jinými složkami, tzv. prekurzory (proenzymy) až po uvolnění v tenkém střevě. Mezi prekurzory patří například trypsinogen nebo chymotrypsinogen. Trypsinogen je aktivován enterokinázou na trypsin a trypsin se poté stává aktivátorem ostatních prekurzorů (Case et al. 2011). Bílkoviny, sacharidy a tuky jsou enzymy

hydrolyzovány na aminokyseliny, dipeptidy, monosacharidy, glycerol, mastné kyseliny, monoglyceridy a diglyceridy. V tenkém střevě vedle rozkladu potravy dále dochází také k absorpci těchto živin spolu s vitamíny a minerály. Strávené živiny se vstřebávají skrz sliznici střeva do krve a lymfatického systému do celého těla (Case et al. 2011).

Obsah tenkého střeva dále vstupuje do tlustého střeva, které se dělí na slepé střevo (*intestinum caecum*), tračník (*colon*) a konečník (*rectum*) (Reece 2011). Slepé střevo je slepě zakončená část tlustého střeva a je poměrně krátké. Na něj navazuje tračník a dále konečník (Červený 2011). V tlustém střevě dochází k mikrobiálnímu trávení. Dosud nestrávené živiny jsou rozkládány mikroorganismy, které se ve střevě nacházejí (Laukner 2007). Produkty tohoto trávení jsou těkavé mastné kyseliny, mezi které patří hlavně kyselina octová, propionová a máselná. Pro kočky jsou tyto kyseliny po vstřebání zpět do těla zdrojem energie, ale především podporují diferenciaci a proliferaci kolonocytů a stimulují vstřebávání vody. Kočky získávají 15 % potřebné energie z těkavých mastných kyselin, což je až pětkrát nižší množství energie v porovnání s přežvýkavci (Reece 2011; Washabau & Day 2012). Hlavní funkcí tlustého střeva je však zpětné vstřebávání vody a elektrolytů, zejména sodíku a chloridu. Zároveň dochází k sekreci draslíku a hydrogenuhličitanu, který pomáhá neutralizovat kyseliny vzniklé mikrobiální fermentací (Saunders 2012). Na rozdíl od tenkého střeva nemá tlusté střevo střevní klky, a proto má díky menšímu povrchu nižší absorpční schopnost. Ačkoli je schopné účinně absorbovat vodu a elektrolyty, nemá mechanismy pro aktivní transport (Case et al. 2011).

V konečníku se skladují výkaly. Výkaly jsou tvořeny mikroorganismy, které se podílejí na trávení, dále nestrávenými zbytky potravy, epitelovými buňkami a dalšími látkami, které jsou vyloučeny řitním otvorem z těla ven (Case et al. 2011).

3.2 Mikrobiota žaludku a střev

Střevní mikrobiota je soubor všech živých organismů, které obývají trávicí trakt. Aktivita těchto organismů závisí na zdraví a pohodě kočky (Washabau & Day 2012). Tento mikrobiální ekosystém stimuluje imunitní systém a vývoj struktury střev, pomáhá v obraně proti patogenům a produkuje mastné kyseliny s krátkým řetězcem a některé vitamíny. Existují však mikroorganismy, které mohou mít i škodlivý vliv na zdraví hostitele. Specifické patogeny jako například *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* nebo enterotoxigenní *Clostridium perfringens* se podílejí na akutním a chronickém gastrointestinálním onemocnění. Jakékoliv poškození střevní mikrobioty může vést k řadě nemocí a poruch. Mimo jiné může docházet k průjmům, alergiím a obezitě hostitele (Suchodolski 2011).

Kočky mají v trávicím traktu vysoký počet mikroorganismů. Jejich trávicí trakt se vyznačuje velkou mikrobiální rozmanitostí (Grzeškowiak 2015). Obsahuje něco mezi 10^{12} až 10^{14} organismů, což je desetinásobek počtu tělesných buněk. Odhaduje se, že střevo obsahuje několik tisíc bakteriálních kmenů. Počty mikroorganismů jsou různé v závislosti na krmení a místě rozšíření. Například v žaludku se nachází 10^1 - 10^6 CFU/g a ve dvanáctníku a lačníku 10^2 - 10^9 CFU/g bakterií. Nejrozmanitější mikrobiotu lze najít na rozmezí tenkého a tlustého střeva, kde se počty kolonií pohybují v rozmezí 10^9 až 10^{11} CFU/g. Podíl bakterií aerobních a

fakultativně anaerobních je vyšší na počátku střeva, zatímco v tlustém střevě převládají anaerobní bakterie (Washabau & Day 2012). Ve srovnání se psy mají kočky v tenkém střevě vyšší počet anaerobních bakterií (Suchodolski 2011).

Dle Washabau & Day (2012) tvoří téměř 99 % střevní mikrobioty kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* a *Fusobacteria* a zbylé 1 % představují kmeny *Tenericutes*, *Verrucomicrobia*, *TM7*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* a několik nezařazených bakteriálních kmenů. Převládají bakterie rodu *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterobacteriaceae*. Ve kterých částech trávicího traktu nalezneme jaké bakterie, uvádí tabulka č. 1. Laktobacily běžně obývají všechny části kočičího trávicího traktu (Grzeškowiak 2015), z nichž nejvyšší počet vykazuje tlusté střevo (Ritchie 2008). Mezi nejběžnější druhy patří *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* a *L. sakei* (Grzeškowiak 2015). Z bifidobakterií se u koček objevují jak zvířecí – *B. animalis* a *B. pseudolongum*, tak lidské typy – *B. catenulatum* a *B. bifidum* (Grzeškowiak 2015). Nicméně studie ukazují, že každý savec má jedinečný mikrobiální profil. Kmeny, a především druhy mikroorganismů se u jednotlivých zvířat liší jak v rámci druhu, tak plemene (Washabau & Day 2012). Masuoka et al. 2017 zkoumali, zda má věk kočky vliv na změnu střevní mikrobioty. Studie ukázala, že počet enterokoků byl významně nižší u starších jedinců než u koťat před odstavením.

Pro identifikaci mikroorganismů, které osídlují trávicí trakt, se používají kultivační techniky a různé molekulární nástroje (Washabau & Day 2012).

Tabulka č. 1: Bakterie nacházející se v částech trávicího traktu (Washabau & Day 2012)

Žaludek	Dvanáctník	Lačník, Kyčelník	Tlusté střevo
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Helicobacter</i>			<i>Firmicutes</i>
			<i>Proteobacteria</i>
			<i>Bifidobacterium</i>
			<i>Eubacterium</i>
			<i>Lactobacillus</i>

3.3 Výživa a základní nutriční potřeby kočky

Kočky jsou obligátní masožravci a jejich požadavky na živiny se od jiných druhů domácích zvířat liší (Laukner 2007). Stejně ale jako ostatní zvířata, vyžadují kočky vyváženou stravu pro správný růst a udržení zdraví. K tomu jsou zapotřebí živiny, které mají specifické funkce v těle a musí být do těla dodávány v potravě. Výjimkou jsou neesenciální živiny, které si kočky mohou syntetizovat samy. Mezi hlavní kategorie živin patří voda, sacharidy, bílkoviny, tuky, minerální látky a vitamíny (Case et al. 2011). Sacharidy, bílkoviny a tuky jsou ve srovnání s minerály a vitamíny v potravě obsaženy ve velkém množství a dodávají kočce energii (Laukner 2007).

Kočky, jakožto predátoři, loví malé kořisti, a to obvykle během dne i noci, měly by tedy potravu přijímat častěji a v menším množství (Sadek et al. 2018). Jejich krmivo by mělo obsahovat vysoký podíl bílkovin, nízký až střední obsah tuku a minimální množství sacharidů, a to z toho důvodu, aby plně nahradilo jejich přirozenou stravu, která se skládá z drobných hlodavců a ptáků (Zoran 2008). Kočky mají také ve srovnání s všežravci a býložravci jiné specifické požadavky na některé aminokyseliny a vitamíny (Scherk 2016).

Tělesná váha kočky je ze 70 % tvořena vodou, která hraje důležitou roli při procesech metabolismu a chemických reakcích. Funguje jako rozpouštědlo chemických látek, umožňuje transport živin a vyloučení odpadních látek a vyrovnává teplotu (Laukner 2007).

Zdrojem vody pro kočku je voda přítomná v potravě, metabolická voda a pitná voda. Množství vody přítomné v potravě závisí na typu krmiva. Komerční suché krmivo obsahuje pouze okolo 7 % vody, oproti konzervovanému krmivu, které obsahuje až 84 % vody. Dle Case et al. (2011) jsou kočky schopné udržovat vodní rovnováhu v těle bez přímého zdroje vody, jestliže jsou krmeny krmivem obsahujícím více než 67 % vody.

S výjimkou vody je nejdůležitější součástí krmiva energie. K vyjádření energetického obsahu složek krmiva u koček se nejčastěji používá metabolizovatelná energie (ME). Energie je vyjadřována v kilokaloriích (kcal) nebo kilojoulech (kJ). Dospělá kočka by měla denně přijmout 50 - 70 kcal ME na kilogram tělesné hmotnosti (Case et al. 2011).

Bílkoviny patří mezi nejdůležitější živiny v potravě koček (Laukner 2007). Požadavky na jejich příjem jsou výrazně vyšší než u psů (Villaverde & Fascetti 2014). U koťat by měla být sušina krmiva tvořena minimálně 30 procenty bílkovin a u dospělé kočky 26 procenty. (AAFCO 2014). Základní stavební jednotkou bílkovin jsou aminokyseliny (Case et al. 2011). Existují dvě skupiny aminokyselin: esenciální a neesenciální. Esenciální aminokyseliny musí být přítomné v potravě, protože si je tělo nedokáže samo syntetizovat. Mezi aminokyseliny, které kočka vyžaduje patří arginin, histidin, izoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan, valin, a především derivát aminokyseliny cysteinu taurin, který lze získat pouze z živočišných bílkovin. Neesenciální aminokyseliny si tělo dovede syntetizovat samo (Agar 2001). Aminokyseliny jsou dále hlavním zdrojem dusíku v těle. Dusík je nezbytný pro syntézu neesenciálních aminokyselin a dalších molekul obsahujících dusík, jako jsou nukleové kyseliny, puriny, pyrimidiny a neurotransmitery (kyselina glutamová, acetylcholin). Aminokyseliny dodávané z potravních bílkovin lze také metabolizovat na energii. ME bílkovin v krmivech pro kočky je přibližně 3,5 kcal/g, tzn. přibližně stejné množství energie dodávané sacharidy. Kočky nejsou schopné ukládat přebytek aminokyselin. Jejich přebytek je vyloučen formou močovininy nebo přeměněn na tuk, který se v těle ukládá a v případě potřeb je využit při získávání energie. Stupeň, v jakém je kočka schopna využívat bílkovinu jako zdroj aminokyselin a dusíku je ovlivněno stravitelností a kvalitou bílkoviny obsažené v potravě. Bílkoviny, které jsou vysoce stravitelné a obsahují všechny nezbytné aminokyseliny v jejich správném poměru jsou považovány za vysoce kvalitní (Case et al. 2011). Nedostatek bílkovin může vést ke špatnému růstu, úbytku tělesné hmotnosti, ztrátě svalstva, špatnému stavu srsti a zhoršené imunitě (Villaverde & Fascetti 2014)

Další důležitou živinou jsou tuky, které poskytují až dvojnásobné množství energie ve srovnání s bílkovinami a sacharidy (Villaverde & Fascetti 2014). Jsou zdrojem esenciálních mastných kyselin, usnadňují vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích a zvyšují chutnost krmiva (Case et al. 2011). Stejně jako v případě esenciálních aminokyselin, je i výskyt

esenciálních mastných kyselin v krmivu nezbytný (Villaverde & Fascetti 2014). Jedná se o kyselinu linolovou, alfa-linolenovou a archidonovou (Agar 2001). V krmivu by dále měla být zastoupena i kyselina eikosapentaenová (EPA) a dokosahexaenová (DHA) (Case et al. 2011). Kočka, na rozdíl od psa, nedokáže konvertovat kyselinu linolovou na kyselinu archidonovou a musí ji získávat pouze z krmiv živočišného původu (Agar 2001). Minimální množství tuku, které by mělo obsahovat krmivo pro dospělé a rostoucí kočky je 9 % v sušině krmiva, z toho 0,6 % kyseliny linolové, 0,02 % alfa-linolenové, 0,02 % archidonové a 0,012 % EPA spolu s kyselinou DHA (AAFCO 2014). Přesto, že se častěji vyskytují problémy spojené s nadměrným příjmem tuku, jejich nedostatek může také způsobovat potíže, a to zejména špatný stav srsti a kůže nebo problémy s reprodukcí (Agar 2001).

Sacharidy nejsou pro kočku nezbytnou živinou. Poskytují energii a glukózu, ale kočky mají rozdílný metabolismus sacharidů než psi. Ačkoli kočky postrádají amylázu ve slinách a mají ve srovnání se psy nižší množství pankreatické amylázy, je jejich hladina glukózy díky specifickému enzymu hexakináze udržena i přes jejich nízký příjem (Villaverde & Fascetti 2014). Dále může být glukóza syntetizována z aminokyselin a glycerolu (Agar 2001). Glukóza patří mezi monosacharidy a je zdrojem energie pro buňky a prekurzorem mnoha důležitých látek jako je vitamín C nebo mastné kyseliny (Villaverde & Fascetti 2014). Pro sacharidy nejsou stanoveny žádné minimální požadavky, ale jejich vysoký obsah v krmivu by mohl být pro zdraví kočky škodlivý. Přebytek by mohl vést například k obezitě či diabetu mellitu (Verbrugghe & Hesta, 2017). Mezi sacharidy patří také vláknina, která má naopak pozitivní vliv na trávení (Landow 2006). Vláknina se skládá ze sacharidů rostlinného původu. Tyto sacharidy odolávají enzymovému trávení, ale mikroorganismy nacházející se v tlustém střevě kočky jsou schopny některé tyto sacharidy rozkládat. Vláknina má také pozitivní účinek na motilitu střev (Agar 2001).

Mezi další pro tělo nezbytné živiny patří vitamíny. Ačkoli jsou vitamíny stejně jako sacharidy, bílkoviny a tuky organické molekuly, nejsou pro kočky zdrojem energie. Fungují jako esenciální enzymy, enzymové prekurzory, koenzymy a uplatňují se tak v mnoha metabolických procesech (Case et al. 2011). Až na pár výjimek, tělo nedokáže vitamíny syntetizovat a musí být dodávány v potravě. Vitamíny dělíme na rozpustné v tucích A, D, E, K a rozpustné ve vodě – vitamín C a vitamíny skupiny B. Přebytečné vitamíny, které jsou rozpustné v tucích, se ukládají v játrech a jejich nadbytek může být toxický a způsobit hypervitaminózu. Naopak vitamíny rozpustné ve vodě se neukládají v těle a jejich přebytek je vyloučen močí (Agar 2001). Pro kočky jsou velmi důležité vitamíny A a D (Case et al. 2011). Kočky postrádají schopnost přeměny neaktivní formy vitamínu D₃ – cholekalciferolu v kůži na jeho aktivní formu a z toho důvodu jsou závislé na příjmu potravinových doplňků obsahujících vitamín D (Parker et al. 2017). Beta-karoten je prekurzorem vitamínu A a je obsažen v mrkvi a listové zelenině. Kočky na rozdíl od jiných druhů savců nejsou schopny přeměny beta-karotenu na retinol, aktivní formu vitamínu A (Green et al. 2012). Nejbohatším zdrojem tohoto vitamínu jsou játra, ledviny, ryby a vaječný bílek. Vitamín E působí jako antioxidant, chrání lipidy před oxidačním poškozením a jeho hladina v těle je ovlivněna selenem. Vyskytuje se v játrech a pšenici (Agar 2001). Vitamín K hraje důležitou roli při srážení krve. Nejbohatším zdrojem tohoto vitamínu je špenát, květák nebo zelí. Živočišné produkty obsahují obecně méně vitamínu K, ale bakterie tlustého střeva ho jsou schopné syntetizovat. V potravě hraje významnou roli v případě snížení bakterií ve střevě například vlivem antibiotik (Case et al. 2011). Vitamíny skupiny B jsou rozpustné ve

vodě, působí jako koenzymy pro specifické buněčné enzymy, které se podílejí na energetickém metabolismu a syntéze tkání. Jedná se o tyto vitamíny: Thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin, pyridoxin (B6), kyselina pantothenová, kyselina listová, biotin, kobalamin (Wortinger 2007). Zdroje a funkce všech potřebných vitamínů jsou uvedeny v tabulce č. 2. U kočky se vyžaduje denní příjem těchto vitamínů (Agar 2001). Minimální a maximální požadavky na vitamíny jsou uvedeny v tabulce č. 3. dle AAFCO. Vzhledem k dostupnosti dobře vyvážených krmiv pro domácí zvířata jsou nedostatky těchto vitamínů a potíže s nimi spojené u koček vzácné (Case et al. 2011). I přesto se může objevit jejich nedostatek, a to v době, kdy dojde k nadměrné ztrátě vody z organismu jako například při průjmu (Agar 2000). Pozor bychom si měli dát také na antivitamíny, které snižují funkci vitamínů (Agar 2001). Jde například o thiaminázu, enzym, který se vyskytuje v syrových rybách. Inhibuje thiamin, který je odpovědný především za metabolismus sacharidů (Wortinger 2007). Dalším antivitaminem je avidin, který je obsažen ve vaječném bílku a inhibuje funkci biotinu (Case et al. 2011).

Tabulka č. 2: Zdroje a funkce vitamínů (Case et al. 2011)

Vitamíny	Zdroje	Funkce
Vitamín A	Olej z rybích jater Játra, ledviny, vaječný žloutek	Prekurzor rodopsinu. Růst a diferenciacie epitelových buněk. Vývoj placenty a spermatogeneze.
Vitamín D	Rybí olej, vaječný žloutek, mléčné výrobky	Vstřebávání vápníku a fosforu ze střeva. Udržování optimální hladiny vápníku a fosforu v krvi a kostech. Tvorba zubů.
Vitamín E	Pšeničné klíčky, olej z kukuřice, bavlníku, sóji a slunečnice	Antioxidant. Chrání buněčné membrány před poškozením volnými radikály vzniklých při metabolických procesech.
Vitamín K	Listová zelenina - špenát, květák, zelí, kapusta	Tvorba protrombinu a koagulačních faktorů.
Thiamin	Maso, pšeničné klíčky	Má vliv na metabolismus sacharidů a funkci nervového systému.
Riboflavin	Mléko, vnitřnosti, zelenina	Součástí enzymatických systémů. Vliv na metabolismus bílkovin a cholesterolu. Správná funkce CNS. Správný růst. Zdravá kůže.
Niacin	Maso, luštěniny	Koenzym. Transport vodíku. Podílí se na intracelulárních procesech.
Pyridoxin	Vnitřnosti, ryby, pšeničné klíčky	Koenzym. Dekarboxylace aminokyselin. Správná funkce nervové soustavy. Tvorba červených krvinek.
Kyselina pantotenová	Játra, ledviny, mléčné výrobky, luštěniny	Koenzym A. Metabolismus sacharidů, tuků a bílkovin.
Biotin	Vaječný žloutek, vnitřnosti	Koenzym. Součástí karboxylázy. Karboxylace. Fixace CO ₂ .
Kyselina listová	Játra, ledviny, listová zelenina	Přenos nervových vzruchů. Tvorba ATP a DNA.
Kobalamin	Maso, ryby, drůbež	Metabolismus nukleových kyselin. Krvetvorba.
C	Citrusové ovoce, tmavě zelená zelenina	Antioxidant. Tvorba kolagenu. Transport vodíku.

Tabulka č. 3: Minimální a maximální požadavky na vitamíny dle Americké asociace kontroly výživy (2014)

Vitamíny	Jednotka*	Minimální množství	Maximální množství**
Vitamín A	MJ/kg	3332	333 300
Vitamín D	MJ/kg	280	30 080
Vitamín E	MJ/kg	40	-
Vitamín K	mg/kg	0,1	-
Thiamin	mg/kg	5,6	-
Riboflavin	mg/kg	4,0	-
Kys. Pantotenová	mg/kg	5,75	-
Niacin	mg/kg	60	-
Pyridoxin	mg/kg	4,0	-
Kys. Listová	mg/kg	0,8	-
Biotin	mg/kg	0,07	-
Kobalamin B ₁₂	mg/kg	0,020	-

*MJ je mezinárodní měrná jednotka určující množství účinné látky, není však vyjádřena hmotností, ale určená dle biologického působení či účinku na organismus.

**V kolonkách s pomlčkou se hodnota neudává.

Minerální látky tvoří nezbytnou součást krmiva. Stejně jako u většiny ostatních živin jsou problémy s minerálními látkami ve stravě obvykle spojeny spíše s nadbytkem či nerovnováhou v důsledku interakcí s jinými živinami než s nedostatkem v krmivu. Vápník, fosfor a hořčík jsou v těle využity jako strukturální složky kostí a zubů. Elektrolyty sodíku, draslíku, fosforu, vápníku a hořčíku jsou součástí tělních tekutin a tkání. Jód a selen se uplatňují jako kofaktory v enzymových a hormonálních systémech (Case et al. 2011). Požadované množství minerálů na sušinu krmiva dle AAFCO uvádí tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Požadované množství minerálů na sušinu krmiva dle Americké asociace kontroly výživy (2014)

Minerály	Jednotka	Minimum	Maximum*
Vápník	%	0,6	-
Fosfor	%	0,5	-
Draslík	%	0,6	-
Sodík	%	0,2	-
Chlorid	%	0,3	-
Hořčík	%	0,04	-
Mangan	mg/kg	7,6	-
Zinek	mg/kg	75	-
Jód	mg/kg	0,6	9,0
Selen	mg/kg	0,3	-

*V kolonkách s pomlčkou se hodnota neudává.

3.4 Vliv výživy na mikrobiotu kočky

Je dokázáno, že výživa a složení krmiva významně ovlivňuje gastrointestinální funkce, složení mikrobioty a metabolických produktů, vzniklých mikrobiální činností ve střevě (Grzeskowiak 2015). Neznalost nutričních požadavků, náhlá změna a přechod na jinou stravu či použití antibiotik mohou ovlivnit strukturu střeva a jeho pohyblivost, čímž může dojít k narušení mikrobioty a její dysbióze (Suchodolski 2011).

Bylo zjištěno, že u koček krmených stravou s vysokým obsahem bílkovin došlo k výraznému snížení počtu probiotických bakterií rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, a zároveň došlo ke zvýšení výskytu škodlivé bakterie *Clostridium prefringens* (Lubbs et al. 2009). Naopak u koček krmených vyšším množstvím rozpustné vlákniny dochází ke zvýšení růstu prospěšných bakterií (Zoran 2008). Rozpustná vláknina působí jako prebiotikum patřící mezi potravinovou složku, která příznivě ovlivňuje růst a aktivitu prospěšných bakterií. Prebiotikem je například inulin, galaktooligosacharidy, laktulóza, fruktooligosacharidy (FOS) a mannanoligosacharidy (MOS). Do krmiva jsou nejčastěji zařazována především vysoce fermentovatelná prebiotika, mezi které patří fruktooligosacharidy a mannanoligosacharidy. Většina druhů bifidobakterií a laktobacilů využívá fruktooligosacharidy jako zdroj energie. Mannanoligosacharidy naopak inhibují růst patogenních bakterií ve střevě a podporují jejich vylučování z těla (Case et al. 2011).

3.5 Probiotika

3.5.1 Historie a definice

Před tisíci lety člověk objevil výhody fermentovaných potravin, z nichž jednou z nich byla prodloužení trvanlivosti potravin. Toto pozorování bylo rozšířeno i na fermentaci krmiva. Starověké důkazy z Egyptských kreseb a starých kartuziánských sil ukazují, že více než před 1000 lety již zemědělci věděli, že siláž byla vynikajícím způsobem, jak uchovat letní plodiny pro jejich zvířata v zimním období (Di Gioia & Biavati 2018). Trvalo však až do počátku 20. století, kdy Louis Pasteur identifikoval mikroorganismy odpovědné za proces fermentace a než vítěz Nobelovy ceny Ilja Iljič Mečnikov poprvé definoval bakterie jako živé mikroorganismy, které jsou prospěšné zdraví (Gasbarrini et al. 2016). Trvalo až do roku 2001, než byl tento koncept definován Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jako „*živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos*“ (FAO/WHO 2001). Dnes je tato definice přeformulována na „*živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v dostatečném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos*“ (Hill et al. 2014). V oblasti výživy zvířat byl však v roce 1989 v USA zaveden Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv termín „direct fed microbial“ (DFM). DFM byl, podobně jako probiotika, zdroj živých, přirozeně se vyskytujících, mikroorganismů. V současné době lze rozlišovat dvě kategorie aplikace DFM: 1) inokulanty krmiv, určené k fermentaci krmného substrátu a změně stravitelnosti a 2) prospěšné, životaschopné mikroorganismy přidané do krmiva kvůli zlepšení zdravotního stavu zvířete (Dole 2016).

Probiotika jsou živé, přesně definované kultury mikroorganismů, které patří do skupiny doplňkových látek (Herzig & Suchý 2006). Pro jejich pozitivní účinek na stravitelnost a využitelnost živin a prevenci proti různým střevním onemocněním jsou lidem přidávány do různých potravinářských výrobků jako jsou mléčné kysané výrobky, sýry či fermentované masné výrobky. Dále mohou být podávány ve formě tablet, kapslí či sypkých prášků. Významnou roli hrají také při podávání zvířatům (Rada 2010). Jsou součástí kompletních krmných směsí nebo k dispozici ve formě tablet, kapslí či past pro hospodářská a domácí zvířata (Wees & Arroyo 2003).

3.5.2 Výběrová kritéria a bezpečnost probiotik

Mikroorganismy musí splňovat určité vlastnosti, aby mohly být použity jako probiotika ve výživě lidí a zvířat (Molina 2019).

Výběr nových probiotických organismů zohledňuje kmeny, a dokonce i geny mikroorganismů prokazující nejpřínosnější účinky. Hodnocení se zaměřuje hlavně na bezpečnost a poměr přínosů a rizik spojených s použitím daného probiotického kmene. Mikroorganismy používané k produkci probiotických přípravků by měly být izolovány od jedinců patřících k druhům, pro něž jsou určeny, protože část zdravotně prospěšných účinků je pravděpodobně druhově specifická. Díky tomuto je získaný biologický materiál maximálně přizpůsoben podmínkám přítomných v zažívacím traktu daného druhu zvířete (Markowiak & Śliżewska 2018).

Pro funkčnost musí mít mikroorganismy schopnost odolávat prostředí trávicího traktu, přilnout ke střevní stěně a kolonizovat trakt zvířete (Molina 2019). Probiotické mikroorganismy přidávané do krmiva by navíc měly být odolné vůči teplotám a tlakům používaných při procesu peletování, proti vlhkosti a účinkům škodlivých látek (těžké kovy, mykotoxiny) během manipulace a skladování krmiv. Dle návrhů WHO, FAO a Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) musí probiotické kmeny ve svém výběru splňovat jak kritéria bezpečnosti a funkčnosti, tak kritéria související s jejich technologickou užitečností (FAO/WHO 2002; EFSA 2007).

Kritéria výběru a požadované vlastnosti probiotických mikroorganismů (FAO/WHO 2002; EFSA 2007):

- Zdravotní nezávadnost (probiotické mikroorganismy by měly být nepatogenní a netoxické pro svého hostitele)
- Přesná taxonomická identifikace
- Přežití v prostředí s nízkým pH
- Rezistence proti žlučovým kyselinám
- Schopnost adheze ke střevním epiteliálním buňkám
- Stabilizace střevní mikrobioty
- Produkce antimikrobiálních látek

- Antagonismus vůči patogenním bakteriím
- Modulace imunitních odpovědí
- Genetická stabilita
- Stabilita a odolnost vůči technologickému zpracování (při jejich nestabilitě lze v některých případech použít různé techniky jako je úprava procesních faktorů během výroby potravin, výběr tolerantnějších kmenů a použití mikroenkapsulace)
- Schopnost rychle se množit a kolonizovat gastrointestinální trakt (krátká generační doba růstu)
- Schopnost pozitivně ovlivňovat zdraví hostitele

Probiotika podléhají předpisům, které jsou obsaženy v zákoně o potravinách a podle nich by měla být bezpečná pro zdraví lidí a zvířat. V USA by mikroorganismy používané pro účely spotřeby měly mít status „Obecně uznávané za bezpečné“ (GRAS). V Evropě zavedl EFSA termín „Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti“ (QPS). Koncept QPS zahrnuje některá další kritéria pro hodnocení bezpečnosti mikroorganismů, včetně historie používání (zkušenosti s používáním mikroorganismu v minulosti) a absence rizika získané rezistence na antibiotika (FDA 2019, EFSA 2007).

V současné době neexistují žádné právní předpisy týkající zavádění probiotických mikroorganismů do potravin a krmiv. Ne všechny výrobky, které obsahují probiotika a jsou uvedena na trh splňují požadovaná kritéria FAO a WHO. Dle doporučení FAO/WHO by také na etiketách probiotických přípravků měli být vyznačeny informace o který rod, druh a kmen mikroorganismu se jedná, jaké minimální množství životaschopných bakterií na konci doby trvanlivosti výrobek obsahuje, na základě vědeckých poznatků by měli být stanoveny zdravotní tvrzení, doporučená dávka a správné podmínky skladování (FAO/WHO 2002).

3.5.3 Obecné účinky probiotik

Účinky probiotických organismů jsou velmi rozmanité a závisí jak na věku zvířete, tak jeho fyziologickém stavu (Rada 2010). Jugan et al. (2017) uvádí jako možné účinky probiotik vytěsnění patogenních bakterií, produkce antimikrobiálních látek, zlepšení funkce epitelové bariéry gastrointestinálního traktu, zlepšení absorpce mikronutrientů a stimulace enterálních a vrozených imunitních odpovědí.

Nejen, že probiotika mohou ovlivnit střevní epitelální bariéru, ale také produkci hlenu. Podporují regeneraci epitelu, zabráňují apoptóze epitelálních buněk, potlačují sekreci elektrolytů během enteropatogenní infekce a jsou zodpovědné za syntézu enzymů, které zlepšují trávení živin a zkracují dobu průchodu tráveniny gastrointestinálním traktem (Torres-Henderson et al. 2017; Di Gioia & Biavati 2018).

Probiotika jsou schopna redukovat patogenní mikroorganismy v trávicím traktu. Rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* mají hydrofóbní povrchové proteiny, které podporují nespécifickou adhezi k živočišným buňkám, pokrývají vazebná místa receptoru a tím brání spojení střevního epitelu s patogenními mikroorganismy. Někteří zástupci rodu *Bifidobacterium*, *Bacillus* a *Lactobacillus* produkují antimikrobiální látky – bakteriociny, které

mají schopnost inhibovat růst patogenních mikroorganismů jako jsou někteří zástupci rodů *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* a zástupci rodu *Salmonella*. Bakteriociny inhibují syntézu jejich buněčné stěny. Rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* produkují organické kyseliny jako jsou kyselina mléčná a kyselina octová. Tyto kyseliny přispívají ke snížení pH v zažívacím traktu a vytvářejí příznivé podmínky pro stávající mikrobiotu a také snižují riziko kolonizace patogenními mikroorganismy (Molina 2019).

Bylo zjištěno, že probiotika mají schopnost modulovat imunitní odpověď hostitele, a to jak vrozenou, tak adaptivní (Molina 2019). Imunitní buňky gastrointestinálního traktu jsou schopné rozpoznat různé druhy probiotických mikroorganismů pomocí bílkovinných Toll-like receptorů, což vede k specifické signální transdukcii. Dochází k produkci cytokinů a následně nespecifické imunitní reakci, například ke zvýšení humorální imunity či produkci IgA. Probiotika mohou hrát důležitou roli v patogenezi a léčbě imunitně zprostředkovaných chorob jako jsou alergie (Wynn 2009).

Laktobacily jsou zodpovědné za syntézu vitamínů skupiny B (niacin, kyselinu panthotenovou, biotin a kyselinu listovou) a některých lipolytických a proteolytických trávicích enzymů, které zvyšují stravitelnost krmiv. Laktobacily a enterobakterie syntetizují také folátové koenzymy. Vysoké koncentrace *Bacteroides* spp. snižují množství kobalaminu v krevním séru. Díky metabolické aktivitě některých probiotických organismů (*Clostridium* spp, *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp a *Eubacterium* spp) dochází k dekonjugaci a sekreci žlučových solí a vysoké koncentrace těchto organismů mohou přispívat k lepšímu trávení a absorpci tuků (Wynn 2009). Studie také prokázaly, že různé kmeny rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* mají schopnost vázat a inaktivovat aflatoxiny (Kneifel & Salminen 2011).

Mikroorganismy používané jako probiotika v krmivech

Krmiva a doplňky obohacené o probiotika mohou obsahovat jeden nebo více bakteriálních kmenů (Markowiak & Śliżewska 2018). Mezi nejčastěji používané probiotické mikroorganismy patří kmeny *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Yirga 2015). V tabulce č. 5 je uveden seznam druhů mikroorganismů pro použití v krmivech pro zvířata.

Tabulka č. 5: Seznam nejpoužívanějších mikroorganismů pro použití v krmech pro zvířata (Gaggia et al. 2010)

Rod	Druhy
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. longum</i> <i>B. pseudolongum</i> <i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. farmicinis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. murinus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. infantarius</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>

3.5.4 Probiotika pro hospodářská zvířata

3.5.4.1 Přežvýkavci

Přežvýkavci jsou nejrozšířenější skupina savců na Zemi. Největší ekonomický zájem leží hlavně v chovu skotu, ovcí a koz. Přežvýkavci jsou schopni prostřednictvím trávicího traktu asimilovat živiny z rostlinných krmiv. Na rozdíl od jiných savců, mají žaludek se třemi předžaludky – bachor, čepec a kniha. Největší mikrobiální rozmanitost se nachází v bachoru, kde probíhá mikrobiální fermentace krmiva. Mikrobiom bachoru je složen ze symbiotických mikroorganismů jako jsou bakterie, prvoci a houby. Tyto mikroorganismy se významně podílejí

na fermentaci rostlinných krmiv a jsou tak nezbytné pro zdraví a produktivitu přežvýkavců (Di Gioia & Biavati 2018).

Probiotika a DFM se přežvýkavcům aplikují za účelem zvýšení počtu bakterií v batoru, léčby poruch trávení, redukci střevních patogenů, stabilizaci pH batoru, zvýšení výkonu zvířat, zvýšení účinnosti přeměny krmiva a stravitelnosti vlákniny, zlepšení složení mléka, stimulace imunitního systému, léčby mastitidy a snížení produkce metanu. Převážná většina aplikací se týká krav a telat. Probiotické přípravky se přežvýkavcům dodávají hlavně orálně – přímo či v krmivu. Pro zajištění stability a životaschopnosti probiotik se začala používat technologie mikroenkapsulace, která poskytuje ochranu a zajišťuje dopravení probiotika do cílového orgánu (Raabis et al. 2019).

Nejčastěji se používají bakterie mléčného kvašení (BMK), a to především rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium* a druhy kvasinek *Sacharomyces* a vláknitá houba *Aspergillus oryzae*. Kromě BMK se používají i jiné bakterie jako jsou *Propionibacterium* spp, *Faecalibacterium* spp, *Bacillus* spp a fibrolytické bakterie rodu *Prevotella* (Raabis et al. 2019). Zatímco použití bakteriálních probiotik se jeví vysoce účinné u telat, probiotické kvasinky a houby jako je *Sacharomyces cerevisiae* a *Aspergillus oryzae*, prokázaly větší přínos u dospělých přežvýkavců. Novorozená telata nejčastěji trpí průjmem, který je způsobený patogenními bakteriemi *Salmonella* spp. nebo *Escherichia coli*. Bylo zjištěno, že po zkrmování fermentovaného mléka obohaceného o BMK novorozeným telatům, došlo k výraznému snížení výskytu průjmů (Di Gioia & Biavati 2018). Podávání probiotických bakterií a kvasinek telatům má také pozitivní vliv na vývoj batoru a zvýšení hmotnostních přírůstků. Dále bylo prokázáno, že podávání kvasinek kravám v mléčném chovu, zvyšuje příjem sušiny a produkci mléka (Gaggia et al. 2010).

3.5.4.2 *Prasata*

Prasata patří mezi monogastrická zvířata, která mají jednoduchý žaludek. Jak žaludek, tak jejich střevo je bohatě osídleno mikroorganismy (Di Gioia & Biavati 2018). Mezi hlavní mikroorganismy trávicího traktu prasat patří laktobacily, bifidobakterie, streptokoky a často se také vyskytují patogenní mikroorganismy - *Clostridium perfringens* a *Escherichia coli* (Pospíšková et al., 2013).

V komerčním chovu prasat je nejvhodnější použít probiotika především v období odstavu selat, ale také po přechodu na pevnou stravu či jiných stresových zátěžích. Tato období jsou charakterizována poklesem příjmu krmiva, který narušuje vývoj zvířete. Tyto faktory mohou negativně narušit funkci imunitního systému a rovnováhu střevní mikrobioty, což vede ke zvýšené náchylnosti k poruchám střev, infekcím a průjmům (Gaggia et al. 2010).

Probiotika jsou prasatům podávána ve formě lyofilizovaných prášků, fermentovaného mléka či fermentovaných krmných směsí (Roselli et al. 2017).

Dle dosavadních studií existuje několik pozitivních účinků probiotik na zdraví prasat. Podávání laktobacilů a bifidobakterií bezprostředně po narození selat, podporuje kolonizaci zdravé a prospěšné mikrobioty, a tím dochází ke snížení výskytu enteropatogenních mikroorganismů (Di Gioia & Biavati 2018). Mezi nejčastěji aplikované laktobacily a bifidobakterie patří druhy *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* a

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis*. Bylo také zjištěno, že denní podávání *Enterococcus faecium* selatům od narození do odstavení snížilo výskyt průjmů, a také došlo ke zvýšení denního hmotnostního přírůstku u selat. Také zástupci rodu *Bacillus* se využívají jako probiotika pro prasata. Bylo zjištěno, že podávání *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* snižuje morbiditu a úmrtnost u nedávno odstavených selat, zlepšuje parametry výkrmových prasat a kvalitu jatečně upravených těl. Mezi méně často využívaná probiotika patří bakterie rodu *Pediococcus* a kvasinky *Sacharomyces* spp. (Gaggia et al. 2010).

3.5.4.3 Drůbež

Na rozdíl od ostatních živočichů mají ptáci zásobní orgán – vole sloužící k uchování potravy. Dále dva žaludky – žláznatý a svalnatý a dvě slepá střeva. Mikroorganismy se vyskytují ve voleti, v žaludku a nejvíce osídlená jsou slepá střeva. Mezi nejčastěji se vyskytující mikroorganismy patří zástupci rodu *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* a *Bacteroides*. Vzhledem k relativně krátkému generačnímu intervalu, je důležité, aby po vylíhnutí došlo co nejdříve k mikrobiální kolonizaci ptačího střeva a střevo tak bylo co nejvíce chráněno před infekčním onemocněním. V komerčních chovech se kuřata líhnou ve sterilních inkubátorech a mladá kuřata postrádají kontakt s přírodním prostředím. Kolonizace střev je tak často dlouhým procesem a brojlerům trvá přibližně 21 dnů, než se u nich vyvine vyvážená střevní mikrobiota. Toto období představuje asi 50% délky jejich života a pokud dochází k pozdější kolonizaci, je střevní ekosystém často kolonizován patogenními mikroorganismy. Mezi další problémy, které mohou narušit ptačí střevní mikrobiotu a mohou vést ke špatnému hmotnostnímu přírůstku a značné ztrátě zásob, patří stres, změna krmiva, použití antibiotik a onemocnění. Časné doplnění probiotik a probiotik po vylíhnutí může být velmi užitečné (Di Gioia & Biavati 2018).

Mezi nejpoužívanější probiotika pro drůbež patří bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a kvasinky jako je *Saccharomyces cerevisiae* (Forte et al. 2018). Účinky probiotik u drůbeže pravděpodobně zahrnují modulaci střevní mikrobioty, vytěsnění patogenů, imunomodulační účinky a zlepšení stavu střevního epitelu. Kromě toho mohou probiotika pozitivně ovlivnit růst a kvalitu masa (Di Gioia & Biavati 2018). Mezi nejčastější patogeny patří *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* a *Escherichia coli* (Gaggia et al. 2010).

Jednou z metod chránící střevní mikrobiotu před patogeny, která byla nejprve pojmenována jako „Nurmiho koncept“ je tzv. kompetitivní exkluze (Schneitz 2005). Tato metoda byla použita proti infekci salmonelou u kuřat a úspěšně testována v 70. letech 20. století. Byla založena na aplikaci střevního obsahu zdravých nosnic čerstvě vylíhnutým kuřatům (Rantala & Nurmi 1973). Od původní publikace Nurmi a Rantala (1973) bylo provedeno značné množství výzkumů, díky kterým bylo jasné, že tato metoda je účinná i co se týče jiných střevních patogenů u drůbeže (Mead 2000).

Forte et al. (2018) hodnotili vliv některých probiotik na kvalitu drůbežního masa. Například příjem *Streptococcus faecium* cernelle v krmivu výrazně snížil pH masa, zatímco *Bacillus cereus* a *Enterococcus faecium* zvýšil pH masa. Dále podávání doplňků obsahujících *Bacillus licheniformis* zlepšilo barvu masa, chuť a šťavnatost masa. V jiné studii byl hodnocen účinek některých zástupců rodu *Lactobacillus*, které po konzumaci výrazně snižovali množství

patogenní bakterie *Salmonella enteritidis* v trusu kuřat (Gaggia et al. 2010). Svejstil et al. (2019) testovali vliv kmene *Clostridium butyricum* CBM 588 na růst a střevní mikrobiotu kuřat. Zjistili, že tento kmen je schopen zvýšit množství butyrátu v slepém střevě, což je sůl kyseliny máselné, která se zde přirozeně vyskytuje a přispívá ke zdraví střev. Dále pozitivně ovlivnil složení střevní mikrobioty a zvýšil užitek brojlerových kuřat.

3.5.4.4 Koně

Gastrointestinální mikrobiota hraje stejně jako u jiných zvířat klíčovou roli při trávení živin, zachování zdraví a dobrých životních podmínek koní. Mikrobiální rovnováhu mohou ovlivnit různé faktory, které často vedou k poruchám a onemocněním jako jsou kolitidy, průjmy, koliky a laminitida koní. Mezi tyto faktory patří například výživa, management, některá léčiva jako anthelmintika, antimikrobiální látky a anestetika, plemeno a věk koně (Schoster 2018).

Nejčastěji používaná probiotika jsou bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus*, avšak tyto mikroorganismy nejsou nejhojnějšími druhy mikroorganismů ve střevě koní a mohou tak mít menší vliv na jejich trávicí trakt a zdraví. Největší množství tvoří bakterie rodu *Clostridium* – *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae* (Garber et al. 2020). Zachování rozmanitosti a zvýšení množství těchto klostridií by mohlo být potenciálním cílem vývoje probiotik u koní. U koní byla doposud pouze jedna studie zaměřená na hodnocení vlivu probiotik na složení mikrobioty hříbat a nebyl pozorován významný účinek (Schoster 2018).

3.5.5 Probiotika pro domácí zvířata

3.5.5.1 Psi

V psím gastrointestinálním traktu převládají stejně jako u koček bakterie kmene *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria*, z čehož největší mikrobiální rozmanitost představuje tlusté střevo. Mezi nejčastější psí enteropatogeny patří *Salmonella* a *Campylobacter* (Grzeškowiak 2015).

Podávání probiotických doplňků či krmiv obsahující prospěšné mikroorganismy je u psů zaměřeno na prevenci či léčbu různých střevních chorob (Di Gioia & Biavati 2018). Některé bakterie mléčného kvašení včetně druhů *Lactobacillus* vykazují v *in vitro* pokusech antimikrobiální aktivitu a jsou schopné pozitivně ovlivňovat střevní mikrobiotu psů. Na základě pokusů bylo zjištěno, že směs laktobacilů (*L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), které byly přidávány do krmiva, prokázali dobrou adhezní schopnost ke střevnímu epitelu a byli schopni z trávicího traktu vytěsnit enteropatogeny jako *Enterococcus canis*, *Clostridium perfringens* a *Salmonella enterica* (Grzeškowiak 2015).

3.5.5.2 Kočky

Existuje velmi málo informací a bylo provedeno jen málo klinických studií o aplikaci probiotik u koček. Vzhledem k rozdílům ve fyziologii hostitele a jeho stravě, nelze účinnost probiotik u koček extrapolovat ze studií uskutečněných u psů (Di Gioia & Biavati 2018).

Bybee et al. (2011) hodnotili vliv probiotika *Enterococcus faecium* SF68® na výskyt průjmu u koček chovaných v útulku. Kočky byly rozděleny do dvou skupin, kdy první skupina byla krmena probiotikem a druhá skupina placebem. Výsledkem bylo, že u koček krmených probiotikem byl ve srovnání s kočkami krmené placebem nižší výskyt průjmu, což naznačuje pozitivní vliv tohoto probiotika na trávení koček. V jiné studii byla hodnocena účinnost tohoto probiotika u koček s chronickou infekcí kočičím herpesvirem 1 (FHV-1). Tento virus je často spojen s morbiditou koček kvůli opakujícím se očním a respiračním infekcím a *E. faecium* je považováno za probiotikum zvyšující imunitu. Výsledkem této studie byla nižší morbidita při podávání této probiotické bakterie (Lappin et al. 2009). Selhání ledvin je častou příčinou morbidity a mortality u koček. Při zhoršené funkci ledvin je žádoucí snížení hladiny močoviny v krvi a keratininu v séru, čehož lze dosáhnout sníženou hladinou proteinů s vysokou biologickou hodnotou. Bylo prokázáno, že směs probiotických bakterií *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium longum* snižuje azotémii u koček a tím snižuje riziko selhání ledvin (Di Gioia & Biavati 2018). Další provedenou studií bylo podávání probiotika *Lactobacillus acidophilus* kočkám s průjmovým onemocněním způsobeným patogenní bakterií rodu *Campylobacter*. Výsledkem bylo snížení těchto patogenních bakterií (Case et al. 2011).

3.5.6 Charakteristika nejpoužívanějších rodů

3.5.6.1 *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* se skládá z více než 40 druhů bakterií (Van Tyne et al. 2013). Jedná se o grampozitivní, nesporulující a fakultativně anaerobní bakterie, které se vyskytují ve formě samostatných koků, v párech nebo v krátkých řetězcích. Jsou klasifikovány jako bakterie mléčného kvašení (BMK). Mají schopnost přeměny glukózy na kyselinu mléčnou. Optimální teplota pro jejich růst je 35 °C a pH 9,6. Produkují aromatické sloučeniny, enzymy a bakteriociny (Araújo & Ferreira 2013).

Přírozeně se vyskytují v potravinách, v gastrointestinálním traktu lidí a zvířat. Používají se jako startovací kultury pro potravinářské produkty jako je sýr, probiotické kultury pro lidi a zvířata a jako přísady do siláží (Gaggia et al. 2010). Enterokoky jsou někdy spojovány s močovými infekcemi, bakteriemií a endokarditidou u lidí. Hostitelem jsou však ovykle pacienti se závažným onemocněním či s poškozenými obrannými mechanismy (Araújo & Ferreira 2013).

3.5.6.2 *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je široká a heterogenní taxonomická jednotka, která zahrnuje více než 100 různých druhů (Gaggia et al. 2010). Patří do skupiny grampozitivních, nesporulujících

fakultativně anaerobních či mikroaerofilních bakterií ve tvaru pravidelných tyčinek (Lee & Salminen 2009). Většina je schopna růstu při 45°C. Jsou chemoorganotrofní – zdrojem energie jsou organické látky (Liong 2011).

Laktobacily jsou schopné fermentovat laktózu a můžeme je rozdělit na tzv. homofermentativní a heterofermentativní dle konečných produktů fermentace. Homofermentativní bakterie produkují pouze kyselinu mléčnou a heterofermentativní vedle kyseliny mléčné také ethanol a oxid uhličitý. Jsou téměř vždy nepatogenní a vyskytují se v různých prostředích (Liong 2011).

Laktobacily se podílejí na fermentaci potravin a krmiv jako je mléko, maso, zelenina a obiloviny, v nichž jsou přítomny buď jako kontaminanty nebo jsou přidávány jakožto startovací kultury zejména do mléčných výrobků (jogurty, sýry), kvašené zeleniny (olivy, okurky, zelí) a masných výrobků (salám, klobásy) (Lee 2009). Přirozeně se také vyskytují v gastrointestinálním traktu, respiračním a pohlavním ústrojí lidí a zvířat (Liong 2011).

3.5.6.3 *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou skupina mikroorganismů, která zahrnuje více než 30 druhů. Jsou to grampozitivní, nesorolující tyčinky. Jejich tvar je nepravidelný, mohou být zahnuté nebo rozvětvené, často bývají ve tvaru Y nebo V (Roy 2011). Jsou striktně anaerobní, ale některé druhy mohou snášet nízké koncentrace kyslíku. Citlivost ke kyslíku stěžuje jejich použití jako probiotik, protože stabilizace produktů s bifidobakteriemi tak, aby splnily požadavky na trvanlivost je obtížná ve srovnání například s laktobacily (Venema & do Carmo 2015). Jejich optimální růstová teplota se pohybuje od 37 do 41 °C. Jsou odolné vůči kyselému prostředí, jejich optimální pH je 6,5 – 7,0, ale některé druhy přežívají i při pH 3,5 (Roy 2011). Bifidobakterie jsou sacharolytické. Fermentací sacharidů produkují kyselinu octovou a kyselinu mléčnou v poměru 3:2 (Venema & do Carmo 2015).

Bifidobakterie také produkují trávicí enzymy, jako je laktáza a fosfatáza. Některé druhy jsou schopny syntetizovat vitamíny a aminokyseliny (Roy 2011). Přirozeně se bifidobakterie vyskytují v trávicím traktu lidí a zvířat. Často se přidávají do potravin, krmiv a do farmaceutických přípravků (Gaggia et al. 2010)

4 Metodika

4.1 Testované vzorky

Byla testována komerčně vyráběná kompletní krmiva pro kočky obsahující, dle deklarace výrobců, probiotické mikroorganismy pro podporu trávení. Dále byl testován i krmný doplněk – pasta, určená jak pro kočky, tak pro psy. Celkem bylo tedy testováno 6 různých vzorků krmiv a jeden krmný doplněk.

Byly provedeny celkem 3 pokusy:

1. Pokus

V prvním pokusu byla testována krmiva, která byla odebrána z původního obalu a skladována v mikrotenovém sáčku několik týdnů při pokojové teplotě. Seznam použitých krmiv v prvním pokusu:

- **Krmivo A** je suché granulované krmivo určené pro dospělé kočky. Výrobce uvádí, že krmivo obsahuje prebiotika a probiotika na podporu zdravého trávení. Použitý bakteriální kmen je *Lactobacillus acidophilus* a *Enterococcus faecium*. Počet těchto mikroorganismů na kilogram krmiva by dle výrobce měl být $3,3 \times 10^8$ KTJ.
- **Krmivo B** je vyvážené suché granulované krmivo. Je určené pro kočky a koťata všech plemen a velikostí. Krmivo obsahuje probiotika pro příznivé trávení. Použitý druh probiotika je *Enterococcus faecium*. U tohoto krmiva výrobce neuvádí počet obsažených probiotických mikroorganismů.
- **Krmivo C** je kompletní suché granulované krmivo, které je určené pro kočky každého věku a všech plemen. Výrobce uvádí, že krmivo obsahuje živé a aktivní kultury mikroorganismů pomáhající podporovat trávicí a imunitní systém. Použité kmeny jsou *enterococcus faecium*, *lactobacillus acidophilus*, *lactobacillus casei*, *lactobacillus plantarum*, *trichoderma longibrachiatum*. Co se týče celkového množství všech obsažených mikroorganismů, výrobce uvádí, že krmivo obsahuje více než $1,6 \times 10^8$ KTJ na kilogram krmiva.

2. Pokus

Ve druhém pokusu byla testována krmiva, která byla odebrána z původního obalu těsně před rozborem a jednalo se tedy o čerstvé granule. Seznam použitých krmiv ve druhém pokusu:

- **Krmivo D** je hypoalergenní suché granulované krmivo. Je určeno pro dospělé kočky a dle etikety obsahuje krmivo probiotikum *Enterococcus faecium*, a to v množství 10×10^8 KTJ/kg krmiva.

- **Krmivo E** je suché granulované kompletní krmivo, které je určeno dospělým kočkám od 1 do 7 let. Jedná se o hypoalergení krmivo pro kočky s citlivým zažíváním a kožními problémy. Výrobce uvádí, že krmivo obsahuje živé bakterie kmene *Enterococcus faecium*, který napomáhá zdravému zaživacímu traktu a posiluje imunitu. Jeden kilogram krmiva obsahuje 100×10^8 KTJ.
- **Krmivo F** je kompletní suché granulované krmivo určené pro dospělé kočky. Krmivo by mělo obsahovat probiotikum *Lactobacillus casei* v množství 150mg/kg krmiva.

3. Pokus

Ve třetím pokusu byla použita stejná krmiva jako ve druhém pokusu, avšak z obalů byla odebrána o týden později. Pro srovnání byl ve třetím pokusu testován také krmný doplněk:

- **Pasta** je doplněk výživy určený pro štěňata, koťata, gravidní či laktující feny a kočky. Výrobce uvádí, že pasta zvyšuje odolnost k bakteriálním infekcím, stresům a fyzickým zátěžím. Obsahuje bakterie, které udržují správnou hladinu probiotických bakterií ve střevě během užívání léků. Použité bakterie jsou kmene *Enterococcus faecium*, a to v počtu 20×10^8 KTJ/g.

4.2 Postup mikrobiologického rozboru

4.2.1 Použitá kultivační media a jejich příprava

Ke každému vzorku byla připravena různá kultivační média, dle druhů probiotických mikroorganismů, které výrobky obsahovaly. Byla připravována dle návodu od výrobce a množství bylo odvozeno od počtu ředění a opakování každého vzorku.

Typy použitých kultivačních médií:

Slanetz and Bartley agar (Oxiod, UK)

Toto médium bylo použito pro detekci enterokoků.

Na 1 litr destilované vody:	Slanetz and Bartley agar	42 g
Složení (g/l):	Tryptóza	20,0
	Kvasničný extrakt	5,0
	Glukóza	2,0
	Hydrogenfosforečnan draselný	4,0
	Azid sodný	0,4
	Trifenyttetrazolium chlorid	0,1
	Agar	10,0

V destilované vodě bylo rozpuštěno navážené množství agarů dle potřebného objemu. Poté byl roztok rozvařen, dokud se agar zcela nerozpustil.

Wilkinson – chalgren agar se sojovým peptonem (Oxoid, UK)

Toto médium bylo použito pro stanovení celkového počtu anaerobních bakterií.

Na 1 litr destilované vody:	Wilkins – chalgren agar	43 g
	Sójový pepton	5 g (Oxoid, UK)
	Cystein	0,5 g (Sigma-Aldrich, USA)
	Tween	1 ml (Sigma-Aldrich, USA)
Složení (g/l):	Trypton	10,0
	Želatina	10,0
	Kvasničný extrakt	5,0
	Glukóza	1,0
	Chlorid sodný	5,0
	L-arginin	1,0
	Pyruát sodný	1,0
	Vitamín K3 (menadion)	0,5
	Hemin	0,005

V destilované vodě bylo rozpuštěno navážené množství agarů dle potřebného objemu a následně vysterilováno při 121 °C v autoklávu po dobu 15 minut.

Rogosa agar (Oxoid, UK)

Toto médium bylo použito pro detekci laktobacilů.

Na 1 litr destilované vody:	Rogosa agar	82 g
Složení(g/l):	Trypton	10,0
	Kvasničný extrakt	5,0
	Gukosa	20,0
	Tween 80	1,0
	Dihydrogenfosforečnan draselný	6,0
	Citrát amonný	2,0
	Acetát sodný	17,0
	Síran hořečnatý	0,575
	Síran manganatý	0,12
	Síran železitý	0,034
	Agar	20,0

V destilované vodě bylo rozpuštěno navážené množství agarů dle potřebného objemu. Roztok byl rozvařen, dokud se agar nerozpustil a poté bylo do roztoku přidáno a zamícháno potřebné množství kyseliny octové (1,32 ml/l destilované vody). Dále byl roztok za častého míchání zahříván na 90-100 °C po dobu 2 minut.

4.2.2 Příprava vzorků

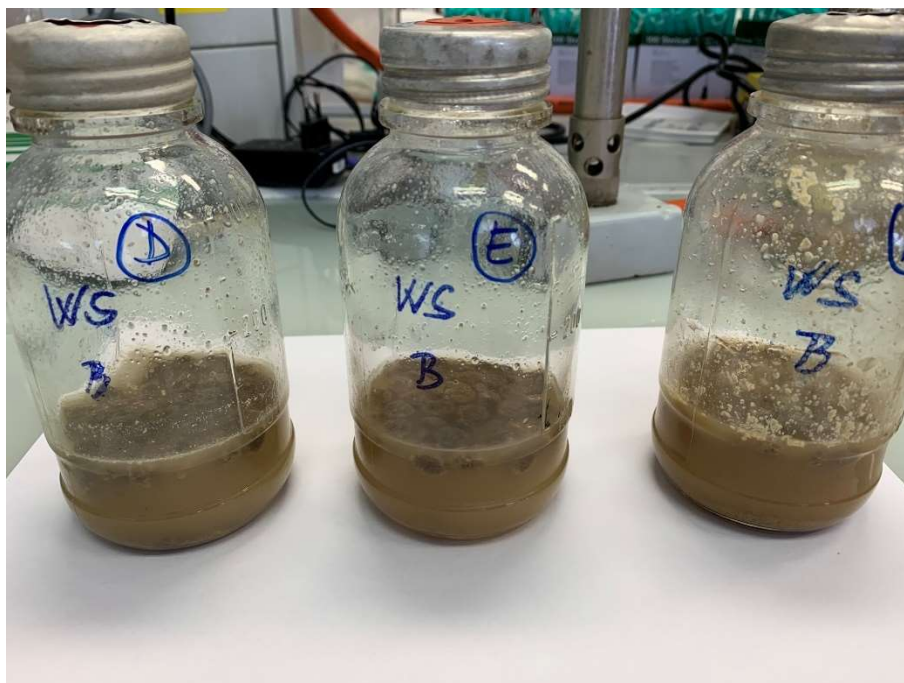
Příprava vzorků se v jednotlivých pokusech lišila následovně:

1. Pokus

V prvním pokusu bylo odebráno několik granulí od každého ze tří krmiv a zhomogenizováno v mixéru. Z každého zhomogenizovaného vzorku byl navážen 1 g, který byl přenesen do zkumavky s 9 ml ředícího média.

2. Pokus

Ve druhém pokusu bylo odebráno 10 g granulí z každého ze tří testovaných krmiv. Toto množství bylo 35 minut louhováno v 90 ml Wilkins – chalgren bujónu, dokud se granule zcela nerozpustily. Takto připravený vzorek byl dále použit k dalšímu ředění.

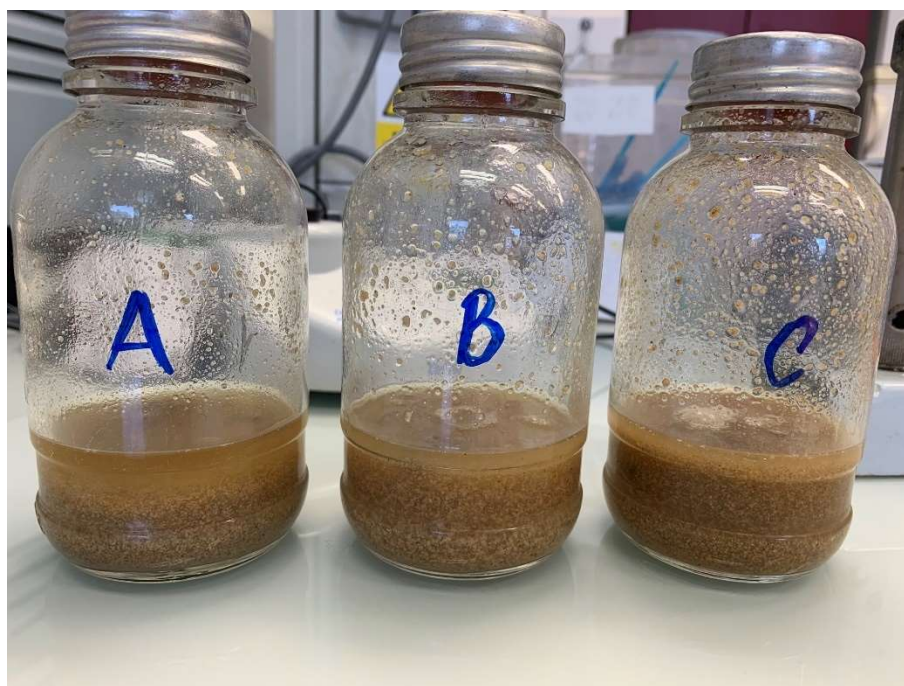


Obrázek č. 1: Rozpouštění celých granulí v bujónu (vlastní dokumentace)

3. Pokus

Ve třetím pokusu byly odebrány granule z každého ze tří testovaných krmiv a následně zhomogenizovány v mixéru. Z každého zhomogenizovaného vzorku bylo naváženo vždy 10 g a louhováno v 90 ml Wilkins – chalgren bujónu. Rozmixované granule byly louhovány 20 minut.

Z krmného doplňku byl odebrán 1 g a rozmíchán ve zkumavce v 35,03 ml média pro ředící řadu. Takto připravené vzorky byly podrobeny dalšímu ředění.



Obrázek č. 2: Rozpouštění rozmixovaných granulí v bujónu (vlastní dokumentace).



Obrázek č. 3: Rozmíchání krmného doplňku – pasty v ředícím médiu (vlastní dokumentace)

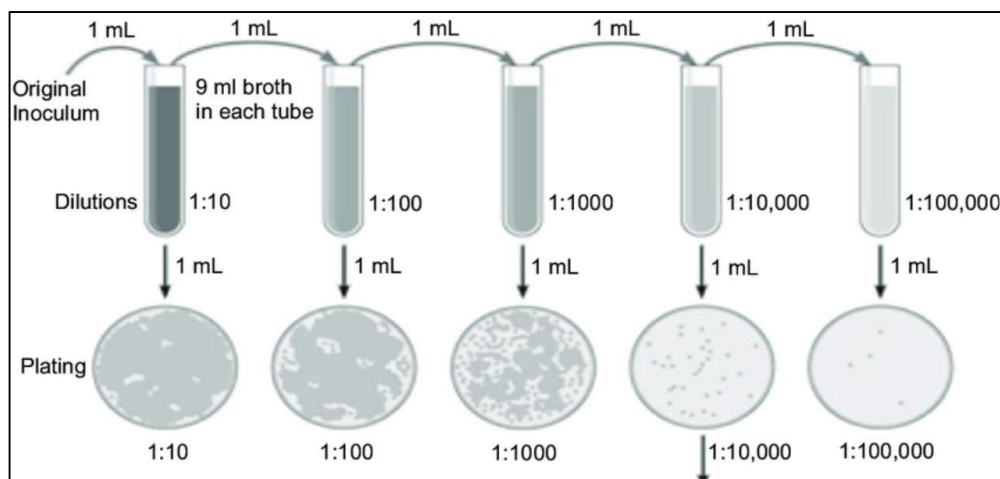
4.2.3 Příprava ředících řad

Dle předpokládaného počtu mikroorganismů ve vzorku určujeme požadovaný stupeň ředění. Díky ředění lze pak snadno spočítat narostlé kolonie ve vzorcích obsahujících vysoký počet mikroorganismů. Vzorky byly ředěny desítkovou metodou.

Nejprve byla navážena směs na výrobu média pro ředící řadu.

Sožení na 1 litr destilované vody:	Trypton	5,00 g
	Nutrient broth No.	2,50 g
	Kvasniční extrakt	2,50 g
	Tween 80	0,50 g
	L-cystein	0,25 g

Připravená směs byla rozvařena a plněna po 9 ml do penicilínek, které byly na 10 minut vloženy do lázně o 100 °C. Po vytažení byly penicilínky probublány CO₂ s pomocí kolony a následně utěsněny pro zajištění anaerobní atmosféry. Poté byly vysterilovány při 120 °C.



Obrázek č. 4: Schéma ředění vzorku pro mikrobiologický rozbor (Singh et al. 2018)

Do první penicilínky byl odebrán vždy 1 ml připraveného vzorku a vzniklo tak ředění 10^{-2} - koncentrace mikroorganismů byla desetinásobně nižší. Z tohoto ředění byl dále přenesen 1 ml do další penicilínky za vzniku ředění 10^{-3} . Takhle se postupovalo až do požadovaného stupně ředění.



Obrázek č. 11: Příprava ředících řad a Petriho misek k izolaci mikroorganismů (vlastní fotodokumentace)

4.2.4 Izolace a kultivace vzorků

Připravené vzorky pro stanovení celkových počtů bakterií byly napipetovány na Petriho misky a zality příslušným agarem. Poté byly krouživými pohyby rovnoměrně promíchány a následně anaerobně kultivovány v anaerostatu. Anaerobní atmosféra byla vyvinuta pomocí systému AnaeroGen Plus (Oxoid, UK).

Vzorky s enterokoky byly izolovány roztěrem na zatuhnutý agar v Petriho miskách. Rozetřeny byly za pomoci sterilní skleněné tyčinky a poté kultivovány aerobně v termostatu.

Vzorky s laktobacily byly napipetovány na Petriho misky, zality příslušným agarem a krouživými pohyby rovnoměrně rozprostřeny. Po zatuhnutí byly znovu přelity jednou vrstvou agaru pro zajištění mikroaerofilního prostředí s nižším parciálním tlakem kyslíku a následně kultivovány v termostatu.

Všechny vzorky byli kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 3 dnů.

4.2.5 Vyhodnocení a identifikace bakterií

V průběhu kultivace vznikají na živných mediích kolonie bakterií. Po kultivaci byly tyto vzniklé kolonie kvantifikovány pomocí deskové metody, která spočívá ve stanovení počtu vzrostlých kolonií v případě, že z každé životaschopné buňky vznikne jedna samostatná kolonie. Z Petriho misek byly spočítány kolonie s pomocí automatického počítadla kolonií.



Obrázek č. 12: Počítání kolonií (vlastní dokumentace)

Výsledky byly pomocí následujícího vzorce vypočítány a vyjádřeny jako počet kolonií tvořících jednotek na 1 gram krmiva (KTJ/g), v angličtině vyjádřeno jako „Colony Forming Units“ (CFU).

Vzorec: $P = [(P1+P2+P3) / 111] \times F$ (KTJ/g)

P1; P2; P3 = počet kolonií spočítaných ze třech po sobě jdoucích Petriho misek

F = převrácená hodnota nejvyššího započítaného ředění

Ve druhém pokusu byly navíc odebrány narostlé kolonie a identifikovány pomocí metody druhové identifikace mikroorganismů hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF za použití identifikačního softwaru MALDI Biotyper RTC (Bruker Daltonik, Německo). Odebrané kolonie byly naneseny po 1 μl na MALDI destičku MTP 384 Steel polished (Bruker Daltonik, Německo) a zakápnuty 1 μl matrice α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (HCCA).

Na závěr byly výsledky z druhého a třetího pokusu statisticky vyhodnoceny analýzou rozptylu (ANOVA) s pravděpodobností 95 % s použitím Scheffého testu. Na statistické vyhodnocení byl použit program STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint Inc, USA).

5 Výsledky

Celkem bylo testováno 6 vzorků krmiv a jeden vzorek krmného doplňku. U všech výrobků deklaroval výrobce určitý obsah probiotických mikroorganismů. Byly provedeny tři pokusy.

V každém pokusu byla provedena kultivace mikroorganismů z vybraných výrobků pomocí kultivačních médií. Ve druhém pokusu byly navíc narostlé kolonie identifikovány pomocí MALDI-TOF.

1. pokus

V prvním pokusu byla ke kultivaci použita tři krmiva, u kterých byl zjišťován celkový počet mikroorganismů, enterokoky a laktobacily. Pouze u vzorku krmiva C byly v jednom opakování prvního ředění detekovány dvě kolonie enterokoků (data nejsou uvedena).

2. a 3. pokus (čerstvé a týden po otevření)

Tabulka č.6: Vyhodnocení kultivace

Vzorek	Krmivo D	Krmivo D týden po otevření	Krmivo E	Krmivo E týden po otevření	Pasta
Deklarovaný druh probiotického mikroorganismu	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Deklarovaný počet probiotický mikroorganismů	6 log KTJ/g	-	7 log KTJ/g	-	9,3 log KTJ
Celkové počty anaerobních bakterií	3,66 ± 0,03 ^D	2,75 ± 0,12 ^A	3,09 ± 0,04 ^{BC}	3,05 ± 0,06 ^{BC}	9,29 ± 0,03 ^E
Enterokoky	2,68 ± 0,11 ^D	2,19 ± 0,09 ^{BC}	2,17 ± 0,17 ^{BC}	2,04 ± 0,04 ^A	9,57 ± 0,04 ^E

Výsledné počty celkových anaerobních mikroorganismů a enterokoků jsou uvedeny v log KTJ/g. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměry dvou měření ± směrodatná odchylka. Písmena v horním indexu vyjadřují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi počty mikroorganismů jednotlivých vzorků krmiv.

Ve druhém pokusu byly kultivačními metodami zjišťovány celkové počty anaerobních mikroorganismů, enterokoky a laktobacily. U krmiva D a E výrobce deklaroval obsah bakterií *Enterococcus faecium*. U těchto krmiv byly enterokoky kultivačními metodami detekovány.

Přesto, že v krmivu D je počet deklarovaných mikroorganismů nižší než u krmiva E, bylo v krmivu D stanoveno 2,68 log KTJ/g, což je o 19,03 % více než v krmivu E. Nicméně ani jeden z výrobků nesplňoval počty mikroorganismů deklarovaných výrobcem.

V krmivu F výrobce deklaroval obsah bakterií rodu *Lactobacillus*, avšak kultivačními metodami nebyl výskyt těchto bakterií detekován (ND).

Dále byla provedena identifikace narostlých kolonií z médií pro enterokoky a celkové počty anaerobních bakterií na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Celkem bylo analyzováno 6 vzorků.

Z 6 analyzovaných vzorků byl u 5 prokázán *Enterococcus faecium*. U vzorku krmiva D odebraného z média Slanetz and Bartley pro enterokoky nebyl identifikován žádný mikroorganismus.

Ve třetím pokusu byly kultivačními metodami zjišťovány opět celkové počty anaerobních bakterií, enterokoky a laktobacily. Z výsledků uvedených v tabulce č. 6 je jasné, že počet stanovených probiotických mikroorganismů byl u krmiva D a E nižší než počet deklarovaných probiotických mikroorganismů výrobcem. Stejně jako ve druhém pokusu se v krmivu značky D vyskytovalo více probiotických organismů než v krmivu značky E, i přesto, že počet deklarovaných probiotických mikroorganismů výrobcem je vyšší u krmiva značky E.

V krmivu F ani ve třetím pokusu nebyl kultivačními metodami detekován (ND) výskyt deklarovaných bakterií.

Ke srovnání byl kultivačními metodami testován i krmný doplněk. V pastě byly zjišťovány celkové počty anaerobních bakterií a enterokoky. Výrobce deklaruje obsah probiotických mikroorganismů *Enterococcus faecium* v počtu 9,3 log KTJ/g. V porování s deklarovaným počtem a počtem stanoveným, bylo zjištěno, že pasta splňuje deklarované počty probiotických mikroorganismů výrobcem.

Nejméně celkových počtů anaerobních bakterií bylo prokázáno ve vzorku krmiva D ze třetího pokusu, kdy byly testovány granule týden po otevření krmiva, a naopak nejvíce celkových počtů anaerobních bakterií bylo prokázáno v krmném doplňku. Enterokoků bylo prokázáno nejméně ve vzorku krmiva E ze třetího pokusu, kdy byly také testovány granule týden po otevření a nejvíce těchto bakterií bylo taktéž prokázáno v krmném doplňku. Zároveň lze vidět rozdíl v počtu narostlých kolonií celkových počtů anaerobních bakterií a enterokoků mezi krmivy ze druhého pokusu, kdy se jednalo o čerstvé granule a ze třetího pokusu, kdy byly testovány granule týden po otevření krmiva. U vzorků s čerstvými granulami bylo prokázáno více mikroorganismů než u granulí týden po otevření krmiv.

Dle analýzy rozptylu, byl největší statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) pouze mezi krmivem D a krmivem D ze třetího pokusu jak v celkových počtech anaerobních mikroorganismů, tak v počtech stanovených enterokoků, kdy se výrazně snížilo množství mikroorganismů po týdnu od otevření. Naopak mezi krmivem E a krmivem E ze třetího pokusu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

Dále lze pozorovat shodné vzorky u celkových počtů anaerobních mikroorganismů v krmivu E ze druhého pokusu a v tomtéž krmivu ze třetího pokusu. U enterokoků se v celkovém počtu narostlých kolonií shodují nejvíce vzorky krmiva D ze třetího pokusu a krmiva E ze druhého pokusu. Největší statisticky významný rozdíl v celkových počtech anaerobních mikroorganismů lze pozorovat mezi granulovaným krmivem D ze třetího pokusu a krmným

doplňkem. Největší statisticky významný rozdíl v počtech enterokoků byl zaznamenán mezi krmivem E ze třetího pokusu a krmným doplňkem.

6 Diskuze

Aby bakterie přidávané do potravin, krmiv a výživových doplňků splňovaly úlohu probiotik, musí se jednat o životaschopné bakterie vyskytující se v produktu v dostatečném množství. Na trhu se nachází mnoho komerčních krmiv, u kterých výrobci uvádí obsah probiotických mikroorganismů, avšak ne všechny výrobky splňují toto kritérium (FAO/WHO 2002). Bylo provedeno mnoho studií, díky kterým bylo zjištěno, že mikroorganismy uváděné na etiketách probiotických produktů nejsou ve výrobku obsaženy a výrobky často obsahují jiné druhy než ty, které jsou na etiketě uváděny. Také počty probiotických bakterií byly v těchto studiích často pod deklarovanou hodnotou či se ve výrobku vůbec nevyskytovaly (Gaggia et al. 2010). Například Huff (2004) testoval 10 komerčních probiotických přípravků, u kterých výrobci deklarovali určité množství životaschopných mikroorganismů rodu *Lactobacillus*. Výsledkem bylo, že 5 z 10 produktů obsahovalo výrobcem uvedené mikroorganismy, které však tvořily pouze 10 % deklarovaného množství. Podobné výsledky byly také pozorovány u probiotických výrobků, které měly dle výrobce obsahovat životaschopné mikroorganismy *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* (Mattarelli et al. 2002), *Lactobacillus crispatus* (Di Pierro et al. 2019), *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium thermophilum* (Weese & Arroyo 2003). Výsledky této práce potvrzují dosavadní studie, kdy ze 7 testovaných výrobků, byly pouze u 4 stanoveny životaschopné mikroorganismy, nicméně pouze jeden z nich splňoval počty uváděné výrobcem na etiketách. Skutečnost, že pouze v jediném výrobku bylo detekováno více probiotických mikroorganismů, než bylo uvedeno na etiketě, může být dána tím, že se jednalo o krmný doplněk ve formě pasty, který mohl projít jinou technologií výrobního procesu než granulovaná krmiva.

Jednou z příčin těchto závěrů může být totiž ztráta životaschopnosti části mikroorganismů již během výrobního procesu. Součástí výrobního procesu probiotik je proces lyofilizace či sprejové sušení. Během těchto procesů může dojít k porušení buněčných stěn, membrán a intracelulárních složek bakterií (Morgan et al. 2006). Další možností je téměř 100% ztráta životaschopnosti vlivem vysokých teplot a tlaků, které jsou na bakterie vyvíjeny během procesu extruze či peletování (Markowiak & Śliżewska 2018). Pokud byly probiotické mikroorganismy naneseny na hotové granule, mohlo dojít například ke špatnému výběru nosného substrátu či ochranných činidel. Některé mikroorganismy totiž přežívají na určitých substrátech lépe než jiné. V případě krmiv pro zvířata, patří mezi vhodné nosné substráty živočišné a rostlinné tuky. Do těchto substrátů mohou být začleněna některá ochranná činidla (vitamíny, aminokyseliny, cukry a proteiny) zlepšující životaschopnost mikroorganismů (Harel & Bennett 2007). Výrobci krmiv testovaných v této práci však neuváděli způsob, jakým byly probiotické mikroorganismy do krmiva přidány, proto lze pouze spekulovat o možných příčinách nepřítomnosti mikroorganismů.

Poruchy způsobené během výrobních procesů mohou vést také ke snížené stabilitě probiotických mikroorganismů během skladování výrobků. Životaschopnost mikroorganismů během skladování může být udržena například sníženou okolní teplotou, kontrolou vlhkosti a zabráněním přístupu kyslíku k výrobku obsahujícího mikroorganismy (Huang et al. 2017). V této práci byly provedeny celkem 3 pokusy, ve kterých se vzorky granulovaných krmiv lišily dobou

od otevření původního obalu do doby provedení pokusu. Ve 2 ze 3 krmiv, která byla testována hned po otevření obalů, se vyskytovalo více probiotických mikroorganismů než v tentýchž krmivech testovaných po týdnu skladování při pokojové teplotě, kdy došlo k přístupu kyslíku. Snížené množství probiotických mikroorganismů v krmivu, které bylo otevřené a teprve za týden testované naznačuje, že by mohlo jít o ztrátu životaschopnosti bakterií způsobenou právě narušením atmosféry. Ve 2 ze 3 krmiv skladovaných stejným způsobem několik týdnů po otevření původního obalu nebyly detekovány žádné životaschopné mikroorganismy. Z výsledků lze tedy konstatovat, že způsob, jakým jsou výrobky skladovány, má vliv na přežívání obsahujících mikroorganismů.

Enterokoky stejně jako laktobacily jsou fakultativně anaerobní (Lee & Salminen 2009; Araújo & Ferreira 2013), z toho důvodu by měly oba rody mikroorganismů vykazovat stejnou citlivost ke kyslíku. V této práci byly však v krmivech testovaných hned po otevření obalu detekovány pouze enterokoky. V krmivu, které mělo obsahovat *Lactobacillus casei*, testovaném také ihned po otevření obalu, nebyl tento mikroorganismus detekován. Tento výsledek může být dán, jak už bylo řečeno, nestabilitou a odolností vybraného druhu mikroorganismu vůči technologickému zpracování, ale také nestandardním uvedením množství mikroorganismů na etiketě. Výrobce u tohoto krmiva totiž uvádí množství probiotických bakterií v miligramech, což není běžný způsob. Počet se obvykle uvádí v KTJ (kolonie tvořící jednotku). Nicméně uvedené množství výrobcem (150mg/kg) by mohlo představovat množství usušených a následně navážených mikroorganismů. Sender et al. (2016) uvádí, že celkový počet buněk v těle se rovná celkovému počtu bakterií (10^{13}) a takové množství tvoří 0,2 kg celkové hmotnosti těla. Pokud bychom tedy dle těchto údajů spočítali hmotnost jedné živé bakterie a pomocí přepočtu stanovili počet deklarovaných probiotických mikroorganismů vyjádřených v KTJ, jednalo by se o množství $2,24 \times 10^{10}$ KTJ /kg krmiva. Během sušení však dochází k dehydrataci bakterií (Huang et al. 2017), tudíž by napočítané množství bylo v tomto případě vyšší. Je ovšem podstatné, zda byla zvolena správná metoda sušení, aby byla co nejméně ovlivněna životaschopnost buněk. V několika studiích byl vliv metod sušení na životaschopnost mikroorganismu *Lactobacillus casei* testován. Byly porovnávány metody lyofilizace a sprejového sušení. Výsledkem bylo, že nejnižší ztráty životaschopnosti mikroorganismů vykazovala oproti sprejovému sušení metoda lyofilizace (To & Etzel 1997; Moayyedi et al. 2018).

V této práci nebyly u vybraných krmiv stanovovány pouze enterokoky, ale také celkové počty anaerobních mikroorganismů. Pro stanovení enterokoků bylo použito selektivní médium, které se používá pro izolaci konkrétního bakteriálního druhu či rodu. Do těchto médií se přidávají různé inhibitory, které znemožňují růst nežádoucích mikrobů nebo naopak látky, které jsou nezbytné pro růst těchto mikrobů (Bonnet et al. 2020). Ve všech granulovaných krmivech bylo detekováno větší množství anaerobních mikroorganismů než enterokoků. Tato skutečnost může být dána tím, že pro stanovení celkových počtů anaerobních mikroorganismů bylo použito univerzální neselektivní médium, na kterém mohou narůst nejen enterokoky, ale také jiné nežádoucí anaerobní mikroorganismy.

Šest ze sedmi výrobků s přidanými probiotickými mikroorganismy použitých pro tento výzkum obsahovalo dle deklarace výrobců probiotikum *Enterococcus faecium*. Převážná většina výrobců uváděla na etiketě daného krmiva a krmného doplňku pozitivní účinek tohoto probiotika na trávicí trakt. *Enterococcus faecium* je mikroorganismus, který se přirozeně vyskytuje v tlustém střevě koček (Washabau & Day 2012). Jako jediný z enterokoků je v Evropské Unii kmen *Enterococcus faecium* SF68 povolen jako doplňková látka pro kočky a psy (Komise EU, 2013). Studie (Bybee et al. 2011, Torres-Henderson et al. 2017) potvrzují pozitivní vliv *Enterococcus faecium* SF68® na trávení u koček, kdy po podávání tohoto probiotika, byl snížen výskyt průjmu. U dvou vybraných testovaných krmiv výrobci také uvádějí, že toto probiotikum pozitivně ovlivňuje imunitní systém. Lapin et al. (2009) zkoumali účinnost tohoto probiotika u koček infikovaných herpesvirem 1 (FHV-1). Z výsledků bylo patrné, že toto probiotikum zvyšuje imunitu koček, což bylo potvrzeno sníženou morbiditou u testovaných druhů. Jak již bylo zmíněno, probiotika pro svůj účinek musí být podávána v dostatečném množství. Markowiak & Śliżewska (2018) uvádí jako doporučenou dávku obsahu probiotických mikroorganismů 10^9 KTJ/kg krmiva, avšak současná legislativa nestanovuje žádné minimální ani maximální limity pro obsah těchto mikroorganismů v krmivech a krmných doplňcích.

7 Závěr

- Výsledky práce naznačují, že komerční krmiva pro kočky nesplňují deklarované počty probiotických mikroorganismů výrobcem.
- Doba od otevření krmiv má vliv na přežívání probiotických mikroorganismů. Výsledky prokázaly vyšší množství probiotických bakterií v čerstvém krmivu než v krmivu týden po otevření obalu. V krmivech otevřených déle než týden, nebyly detekovány téměř žádné probiotické mikroorganismy.
- Vzhledem k výsledkům této práce i jiných provedených studií, by bylo přínosné zavedení řádných kontrol kvality produktů obsahujících probiotika, která by se zaměřila především na jejich účinnost u daného druhu hostitele. Na producenty probiotických krmiv a krmných doplňků by měl být vyvíjen tlak, kdy by měla být požadována řádná identifikace druhu mikroorganismu obsaženého ve výrobku a uvedené množství by odpovídalo skutečnému obsahu. Bez legislativních předpisů týkajících se zavádění probiotik do krmiv a krmných se stávající situace pravděpodobně nezmění.
- Účinnost probiotik v krmivech pro kočky zatím také není plně prozkoumána a budoucí studie by se měli zaměřit na stanovení mechanismu účinku.
- Hypotéza v této práci se nepotvrdila. Počty stanovených probiotických mikroorganismů nejen, že nepřevyšovaly množství deklarované výrobcem, ale ani jej zdaleka nedosahovaly.

8 Literatura

AAFCO. 2014. AAFCO METHODS FOR SUBSTANTIATING NUTRITIONAL ADEQUACY OF DOG AND CAT FOODS. Proposed Revisions Edited per Comments for 2014 Official Publication. USA.

Agar S. 2001. Small animal nutrition. Butterworth-Heinemann. Boston.

Araújo T, Ferreira C. 2013. The Genus *Enterococcus* As Probiotic: Safety Concerns. Brazilian Archives of Biology and Technology. **56**: 457-466.

Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. 2020. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*. **34**.

Bybee SN, Scorza AV, Lappin MR. 2011. Effect of the Probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on Presence of Diarrhea in Cats and Dogs Housed in an Animal Shelter. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **25**: 856-860.

Case LP. 2011. Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals. 3rd ed. Mosby. Maryland Heights, Mo.

Červený Č. 2011. Vademecum anatomie domácích savců pro studium a veterinární praxi. Brázda. Praha.

Di Gioia D, Biavati B. 2018. Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety. Springer International Publishing. Cham.

Di Pierro F, Polzonetti V, Patrone V, Morelli L. 2019. Microbiological Assessment of the Quality of Some Commercial Products Marketed as *Lactobacillus crispatus*-Containing Probiotic Dietary Supplements. *Microorganisms*. **7**: 524.

Dole MP. 2016. Efficacy of Direct Fed Microbial Components Compared to Traditional Feeding Programs Against Salmonellosis and Performance of Turkey Poults. Master's thesis, Texas A&M University.

EFSA. 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. *The EFSA Journal*. **587**: 1-16.

Komise EU. 2013. PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1061/2013 o povolení přípravku *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 jako doplňkové látky pro telata, kůzlata, kočky a psy a o změně nařízení (ES) č. 1288/2004. Úřední věstník EU. Brusel.

FAO/WHO Working Group. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. London Ontario, Canada.

FDA. 2019. Title 21 Food and drugs, Chapter 1 Food and Drugs Administration Department of Health and Human Services, Part 1 General Enforcement Regulation. United States. 21CFR1.

- Forte C, Manuali E, Abbate Y, Papa P, Vieceli L, Tentellini M, Trabalza-Marinucci M, Moscati L. 2018. Dietary *Lactobacillus acidophilus* positively influences growth performance, gut morphology, and gut microbiology in rurally reared chickens. *Poultry Science*. **97**: 930-936.
- Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. **141**: 15-28.
- Garber A, Hastie P, Murray J. -A. 2020. Factors Influencing Equine Gut Microbiota: Current Knowledge. *Journal of Equine Veterinary Science*. **88**.
- Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. 2016. Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **50**: 116-119.
- Green AS, Tang G, Lango J, Klasing KC, Fascetti AJ. 2012. Domestic cats convert [2 H 8]- β -carotene to [2 H 4]-retinol following a single oral dose. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **96**: 681-692.
- Grześkowiak Ł, Endo A, Beasley S, Salminen S. 2015. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*. **34**: 14-23.
- Harel M, Bennett A. 2007. Dry food product containing live probiotic. Advanced Bionutrition Corporation. United States. US8460726B2.
- Herzig I, Suchý P. 2006. *Výživa a infekční nemoci zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby. Praha.*
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson G, Merenstein DJ, Pot BDF, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen SJ, Calder P, 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**.
- Huang S, Vignolles M. -L., Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R. 2017. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*. **63**: 1-17.
- Hudson LC, Hamilton WP. 2010. *Atlas of feline anatomy for veterinarians*. Saunders. Philadelphia, Pa.
- Hüsemann L. 2010. *Kočka: chov, bydlení, hry*. Grada. Praha.
- Jugan MC, Rudinsky AJ, Parker VJ, Gilor C. 2017. Use of probiotics in small animal veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **250**: 519-528.
- Keifel W, Salminen S. 2011. *Probiotics and Health Claims*. Blackwell Publishing Ltd. UK.
- Landow MV. 2006. *Trends in dietary carbohydrates research*. Nova Science Publishers. New York.
- Lappin MR, Veir JK, Satyaraj E, Czarnecki-Maulden G. 2009. Pilot Study to Evaluate the Effect of Oral Supplementation of *Enterococcus Faecium* SF68 on Cats with Latent Feline Herpesvirus 1. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. **11**: 650-654.

Laukner A. 2007. Kočka - správné krmení: zdravě, chutně, jednoduše. Grada. Praha.
Lee YK, Salminen S. 2009. Handbook of Probiotics and Prebiotics. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

Liong MT. 2011. Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects. Springer. Berlin.
Lubbs DC, Vester BM, Fastinger ND, Swanson KS. 2009. Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **93**: 113-121.

Markowiak P, Śliżewska K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*. **10**.

Masuoka H, Shimada K, Kiyosue-Yasuda T, Kiyosue M, Oishi Y, Kimura S, et al. (2017) Transition of the intestinal microbiota of cats with age. *PLoS ONE* 12 (e0181739) DOI: 10.1371/journal.pone.0181739

MEAD GC. 2000. Prospects for 'Competitive Exclusion' Treatment to Control Salmonellas and Other Foodborne Pathogens in Poultry. *The Veterinary Journal*. **159**: 111-123.

Mínguez RE. 2017. Practical atlas of nutrition and feeding in cats and dogs. Grupo Asís Biomedia S. L. Spain.

Moayyedi M, Eskandari MH, Rad AHE, Ziaee E, Khodaparast MHH, Golmakani MT. 2018. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*. **40**: 391-399.

Molina A. 2019. Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*. 601-611.

Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*. **66**: 183-193.

Nurmi E, Rantala M. 1973. New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature*. **241**: 210-211

Parker VJ, Rudinsky AJ, Chew DJ. 2017. Vitamin D metabolism in canine and feline medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **250**.

Pospíšková P, Zorníková G, Kolářová M, Sládek Z, Komprda T, Geršiová J. 2013. Effect of probiotics in the pig nutrition on the pathogenic bacteria counts in the gut. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. **61**: 1839-1843.

Raabis S, Li W, Cersosimo L. 2019. Effects and immune responses of probiotic treatment in ruminants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **208**: 58-66.

Rada V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína*. **12**: 92-97.

- Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada. Praha.
- Ritchie LE, Steiner JM, Suchodolski JS. 2008. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. **66**: 590-598.
- Roselli M, Pieper R, Rogel-Gaillard C, de Vries H, Bailey M, Smidt H, Lauridsen C. 2017. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. *Animal Feed Science and Technology*. **233**: 104-119.
- Roy, D. 2011. Probiotics. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier. 591-602.
- Sadek T, Hamper B, Horwitz D, Rodan I, Rowe E, Sundahl E. 2018. Feline feeding programs: Addressing behavioural needs to improve feline health and wellbeing. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. **20**: 1049-1055.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*. **14**.
- Scherk M. 2016. Controversies surrounding protein in feline nutrition. *Advances in Small Animal Medicine and Surgery*. **29**: 1-3.
- Schneitz C. 2005. Competitive exclusion in poultry—30 years of research. *Food Control*. **16**: 657-667.
- Schoster A. 2018. Probiotic Use in Equine Gastrointestinal Disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. **34**: 13-24.
- Singh NA, Kumar N, Vishweswaraiyah RH. 2018. *Microbial Aspects of Drinking Water*. IK International Publisher. New Delhi.
- Suchodolski JS. 2011. Intestinal Microbiota of Dogs and Cats: a Bigger World than We Thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **41**: 261-272.
- Svejstl R, Plachy V, Joch M, Salmonova H, Duskova D, Hautekiet V, Vlkova E. 2019. Effect of probiotic *Clostridium butyricum* CBM 588 on microbiota and growth performance of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*. **64**: 387-394.
- To, BCS, Etzel MR. 1997. Spray Drying, Freeze Drying, or Freezing of Three Different Lactic Acid Bacteria Species. *Journal of Food Science*. **62**: 576-578.
- Toman M. 2009. *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Grada. Praha.
- Torres-Henderson C, Summers S, Suchodolski J, Lappin MR. 2017. Effect of *Enterococcus Faecium* Strain SF68 on Gastrointestinal Signs and Fecal Microbiome in Cats Administered Amoxicillin-Clavulanate. *Topics in Companion Animal Medicine*. **32**: 104-108.
- Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. 2013. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins*. **5**: 895-911.

Venema K, Do Carmo AP. 2015. Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends. Caister Academic Press, U.K.

Verbrugghe A, Hesta M. 2017. Cats and Carbohydrates: The Carnivore Fantasy? *Veterinary Sciences*. **4**.

Villaverde C, Fascetti A. J. 2014. Macronutrients in Feline Health. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **44**: 699-717.

Washabau RJ, Day MJ. 2012. *Canine and Feline Gastroenterology*. Saunders. Missouri.

Weese JS, Arroyo L. 2003. Bacteriological evaluation of dog and cat diets that claim to contain probiotics. *Can Vet J*. **44**:212-6.

Wortinger A. 2007. *Nutrition for veterinary technicians and nurses*. Blackwell Pub. Professional. Ames, Iowa.

Wynn SG. 2009. Probiotics in veterinary practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **234**: 606-613.

Yirga H. 2015. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Journal of Probiotics & Health*. 03 (02).

Zoran DL. 2008. Nutritional Management of Feline Gastrointestinal Diseases. *Topics in Companion Animal Medicine*. **23**: 200-20