

**Vědecký výbor výživy zvířat**

**PROBIOTIKA A PREBIOTIKA  
VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT**

**Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.  
Prof. Ing. Milan Marounek, DrSc.**

Praha, červen 2005



**Výzkumný ústav živočišné výroby**  
Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,  
PSC: 104 01, [www.vuzv.cz](http://www.vuzv.cz)

## Souhrn

Předložená studie shrnuje možnosti uplatnění probiotik, prebiotik a antimikrobiálních látek neantibiotické povahy ve výživě hospodářských zvířat. Definuje tyto kategorie krmných doplňků a zabývá se jejich vlastnostmi i použitím. U probiotik pojednává o jejich výběru a vhodnosti k danému účelu, také o bakteriích mléčného kvašení, bifidobakteriích i dalších mikroorganismech. U prebiotik je položen důraz na oligosacharidy s bifidogenním účinkem. V případě antimikrobiálních látek je věnována pozornost mannanoligosacharidům, rostlinným extraktům a organickým kyselinám. Z dosavadních praktických zkušeností a z údajů odborné literatury lze učinit závěr, že nejúčinnější použití probiotik je u mladých zvířat, s tím, že ideálním objektem pro aplikaci je mladá drůbež. Probiotické kultury mohou u drůbeže potlačit rozvoj salmonel. Jejich účinek se zvyšuje prebiotiky. Na dobrém teoretickém základě stojí použití mannanoligosacharidů. Otázkou však je, zda obvyklé dávkování (2 - 4 g/kg) je dostačující a zda není spíše limitováno cenou preparátu. Některé výhrady lze uplatnit k použití rostlinných extraktů. Jedná se o směsi účinných látek, z nichž některé mohou mít po vstřebání i nepříznivé účinky. Otázkou také je, do jaké míry je jejich kvalita standardní. Literární údaje o účinku rostlinných extraktů často nejsou konsistentní a je třeba pokračovat v jejich zkouškách.

Účinek většiny organických kyselin, které mají nízké  $pK_a$ , je omezen na sekce trávicího traktu s nízkým pH (žaludek, asi i volec). Mastné kyseliny o střední délce řetězce působí v širším rozmezí pH, nevýhodou je však omezená dostupnost za přijatelnou cenu. Je proto třeba zkoušet jejich podávání ve formě triacylglycerolů, možná i s přídavkem lipasy. Je třeba hledat nové kmeny probiotických bakterií, které budou specifické pro určité kategorie hospodářských zvířat. Studie „Probiotika a prebiotika ve výživě zvířat“ přísluší do oblasti, ve které se výrazně uplatňuje komerce. Měl by proto být podpořen takový výzkum, který není na komerčních zájmech závislý a je kriticky zaměřen.

# Obsah

Úvod .....	4
<b>Použití antibiotik ve výživě hospodářských zvířat .....</b>	<b>4</b>
<b>Probiotika .....</b>	<b>8</b>
➤ <i>Definice a historie používání .....</i>	8
➤ <i>Mikroorganismy používané jako probiotika .....</i>	9
➤ <i>Testování probiotických mikroorganismů .....</i>	11
➤ <i>Aplikace probiotik .....</i>	13
➤ <i>Mechanismus účinku probiotik .....</i>	15
➤ <i>Probiotika pro drůbež .....</i>	16
➤ <i>Probiotika pro prasata .....</i>	18
➤ <i>Probiotika pro přežvýkavce .....</i>	20
<b>Prebiotika .....</b>	<b>21</b>
➤ <i>Definice a historie používání .....</i>	21
➤ <i>Fruktooligosacharidy (FOS) a inulin .....</i>	21
➤ <i>Laktulosa .....</i>	22
➤ <i>Galaktooligosacharidy (GOS) a sojové oligosacharidy (SOS) .....</i>	22
➤ <i>Isomaltooligosacharidy (IMO) .....</i>	22
➤ <i>Xylooligosacharidy (XOS) .....</i>	23
➤ <i>Pokusy na zvířatech .....</i>	23
<b>Shrnutí .....</b>	<b>24</b>
<b>Možnosti náhrady antibiotik jinými látkami s antimikrobiálním účinkem .....</b>	<b>25</b>
➤ <i>Mannan oligosaccharidy .....</i>	25
➤ <i>Immunostimulační účinky mannan oligosaccharidů .....</i>	25
➤ <i>Použití mannan oligosaccharidů ve výživě zvířat .....</i>	25
➤ <i>Rostlinné extrakty .....</i>	26
➤ <i>Organické kyseliny .....</i>	27
➤ <i>Použití organických kyselin ve výživě zvířat .....</i>	28
➤ <i>Srovnání účinku organických kyselin na enteropathogenní bakterie .....</i>	28
➤ <i>Použití antimikrobiálně aktivních lipidů ve výživě zvířat .....</i>	31
➤ <i>Měď a další prvky s vyšší atomovou hmotností .....</i>	32
➤ <i>Enzymy .....</i>	32
<b>Závěrečné poznámky .....</b>	<b>33</b>
<b>Seznam literatury .....</b>	<b>33</b>

## Úvod

Doba přelomu 20. a 21. století postavila výzkum živočišné výživy v evropských zemích před řadu problémů. Je to zejména postupný zákaz plošného používání antibiotik a zákaz komponent živočišného původu v krmných směsích. Důvodem je potřeba zvýšit bezpečnost potravního řetězce a kvalitu živočišných produktů. Použití probiotik a prebiotik nabylo aktuálnosti v souvislosti s prvním uvedeným zákazem. **Probiotika** jsou živé kultury mikroorganismů, které jsou přidávány do potravin a krmiv. **Prebiotika** jsou nestavitelné složky potravy (většinou sacharidy), které v trávicím traktu stimulují rozvoj prospěšných mikroorganismů (podrobné definice viz. speciální kapitoly). Kombinace probiotik a prebiotik se nazývají **synbiotika**. Výčet možností jak ovlivnit střevní mikrofloru by nebyl úplný, kdybychom pominuli látky, které mají účinek antimikrobiální, nepatří však k antibiotikům a mohou být jejich náhradou (**antimikrobiální látky neantibiotické povahy**).

## Použití antibiotik ve výživě hospodářských zvířat

### ➤ *Historie a předpokládaný způsob účinku*

Použití mikrobiálních látek ve výživě hospodářských zvířat má již dlouhou historii. Moore a kol. (1946) byli první, kdo upozornili, že antimikrobiální sloučeniny zvyšují, po přidání do krmné směsi kuřat, rychlost růstu až o 30%. Aby vysvětlili své pozorování, vyslovili názor, že střevní bakterie produkují toxiny, které brzdí růst zvířat, aniž by vyvolaly příznaky onemocnění. Ve stejné době Morehouse a Mayfield (1946) pozorovali stimulaci růstu účinkem sloučeniny arsenu přidané do krmné směsi pro kuřata a krůtata. Riedel a kol. (1949) zjistili zvýšení růstové rychlosti kuřat působením kvarterní amoniové soli. Tyto látky bychom dnes označili jako tzv. neantibiotické stimulatory růstu. V padesátých letech pak bylo věnováno velké výzkumné úsilí zkouškám účinku pravých antibiotik, tj. látek mikrobiálního původu. Zkouškám čistých antibiotik předcházelo zkrmování mycelia, které bylo odpadem z výroby penicilinu, chlortetracyklinu a dalších antibiotik. Přehled publikovaných prací je natolik obsáhlý, že odkazujeme na specializovaný článek (Visek, 1978). V těchto pracích byl účinek antimikrobiálních látek dále upřesňován. Kromě produkce toxinů byla bakteriím trávicího traktu přičtena i destrukce části živin. Střevní stěna bezmikrobních zvířat je tenčí. Z toho vyplynula představa, že potlačením střevní mikroflóry se zvýší účinnost vstřebání a využití živin potravy. Střevní bakterie způsobují také dekonjugaci, tj. rozkládají glukuronidy škodlivin, které játra vylučují žlučí, umožňují tudíž jejich opět vstřebání a nutnost nové

detoxikace. Z dusíkatých sloučenin, přítomných ve střevním obsahu, bakterie uvolňují amoniak a sirovodík, což jsou látky škodící organismu. U bezmikrobních zvířat, či zvířat přijímajících antibiotika, je koncentrace amoniaku v zažitině nízká. Amoniak je buněčný jed, zatěžující játra nutností přeměny na močovinu.

V průběhu 50ti let bylo celosvětově vyrobeno a spotřebováno více než 1 milion tun antibiotik, z toho polovina byla užita v zemědělství (Teuber, 2001). V zemědělství jsou antibiotika používána k terapii a profylaxi onemocnění a k urychlení růstu či zlepšení konverze krmiva. Veterinární použití antibiotik zahrnuje léčbu infekčních onemocnění střevního a respiračního ústrojí, abscesů a mastitid. Pro stimulaci růstu se antibiotika používají v subterapeutických koncentracích, přidávaná do krmných směsí, odtud termín „krmná antibiotika“. Většina z nich jsou látky působící proti grampozitivním bakteriím, růstově-stimulační účinek však mají i antibiotika působící proti bakteriím gramnegativním. Mechanismus účinku proti bakteriální buňce není rozhodující, tzn. uplatňují se antibiotika inhibující bakteriální proteosyntézu, syntézu peptidoglykanu i antibiotika interferující s transportem iontů přes buněčnou stěnu. Antibiotika poslední skupiny, tzn. ionofory se uplatňují jako kokcidiostatika, vedle nich se proti parazitickým prvokům používá i řada syntetických sloučenin.

### ➤ *Rizika*

Pokrok ve výrobě antibiotik vedl k jejich výraznému zlevnění. Použití antibiotik v zemědělství je proto ekonomicky výhodné. V průběhu let se podařilo odstranit některé nedostatky prvních komerčně využívaných krmných antibiotik. Začala se používat antibiotika s vyšší molekulovou hmotností, která se nevstřebávala střevní stěnou a odpadlo tudíž riziko vzniku reziduí antibiotik v požitelných tkáních. Závažnějším rizikem se ukázal vznik rezistence vůči antibiotikům. Bakterie může antibiotikum inaktivovat rozštěpením (např. penicilinasou), vytvořit metabolický bypass, tj. obejít zablokovanou metabolickou dráhu nebo změnit konformaci místa na povrchu buňky, kde se antibiotikum váže. Široké používání antibiotik vede k selekci kmenů, které jsou k antibiotikům rezistentní, přičemž se nejedná jen o bakterie trávicího traktu, uvážíme-li, že s exkrementy zvířat se antibiotika dostávají do prostředí. Geny pro resistenci jsou navíc často přítomny v plasmidové DNA, kterou si bakterie mohou předávat. S vědomím nebezpečí šíření rezistence mezi bakteriemi významnými při onemocnění člověka, byla v roce 1969 publikována zpráva Swannovy komise, která doporučila rozdělit antibiotika na ta, která se používají ve výživě zvířat a na antibiotika užívaná v humánní medicíně. Obavy z šíření rezistence vedly v 70. letech

k širokému používání neantibiotických stimulátorů růstu, připravovaných chemickou syntézou. Jednalo se o látky typu nitrofuranu (nitrovin) nebo o deriváty chinoxalinu (olachindox, karbadox). Původní čs. látkou této řady byl cyadox (Škarka a kol., 1988). Tyto stimulatory růstu zanechávaly rezidua v tkáních, což se řešilo ochrannou lhůtou, tj. vypuštěním látky z krmné směsi před porážkou.

Opatření doporučené Swannovou komisí neřešilo problém zkřížené rezistence na antibiotika používaná při léčbě lidí, náležející ke stejné třídě sloučenin jako krmná antibiotika. Existuje např. zkřížená rezistence mezi glykopeptidovým krmným antibiotikem avoparcinem a vankomycinem, užívaným k léčbě infekčních onemocnění lidí. V roce 1994 byly ve Velké Británii izolovány ze zvířat enterokoky rezistentní ke glykopeptidovým antibiotikům a byl vysloven názor, že zvířata v tomto případě představují reservoár kmenů způsobujících houževnaté, těžko léčitelné nemocniční infekce (Wegener, 2003). Používání antibiotik ve výživě zvířat za účelem stimulace růstu se proto stalo předmětem kritiky veřejnosti a tématem politických diskusí. V pozadí přijatých opatření byla kromě racionálních úvah jistě i snaha snížit jednoduchým administrativním opatřením zemědělskou nadvýrobu v zemích EU. Jako první zakázalo plošné používání antimikrobiálních látek ve výživě hospodářských zvířat v roce 1986 Švédsko (Brož, 2004). Následkem tohoto zákazu vzrostlo množství antibiotik spotřebovaných v podobě medikovaných krmiv. Spotřeba antibiotik v zemědělství proto klesla pouze zhruba na polovinu. Používání avoparcinu, způsobujícího zkříženou rezistenci k vankomycinu bylo v Dánsku zakázáno v roce 1995, v Německu v roce 1996 a o rok později v celé EU. S platností od 1. 7. 1999 byla v EU zakázána antibiotika spiramycin, tylosin, virginiamycin a bacitracin. Rovněž chinoxalinové deriváty karbadox a olachindox. V současné době končí používání zbývajících čtyř krmných antibiotik, kterými jsou flavomycin, avilamycin, monensin (ve výkrmu skotu) a salinomycin. Ve výkrmu drůbeže lze používat jen první dvě zmíněná antibiotika. Zákaz se zatím nevztahuje na antibiotika ionoforová (salinomycin, monensin), používaná k prevenci kokcidiosy drůbeže.

Obdobný zákaz zatím není uplatňován v U.S.A. Nutno říci, že zákaz má i negativní důsledky. Dojde ke snížení rychlosti růstu zvířat ve výkrmu (prasat i drůbeže), zhoršení konverze krmiva a potažmo ekonomiky chovů. Dají se očekávat i určité zdravotní problémy jako např. větší výskyt nekrotické enteritidy ve výkrmu brojlerů (Brož, 2004). Existují značné obavy z pomnožení *Clostridium perfringens* v trávicím traktu a zvýšení výskytu klostridiálních onemocnění u drůbeže (Shane, 2002). Rovněž je možno předpokládat, že zákaz užívání antibiotik povede u drůbeže k proliferaci určitých patogenních bakterií v trávicím traktu. Při zpracování brojlerových kuřat se neužívá tepelné ošetření a pokud dojde

ke kontaminaci jatečných těl obsahem trávicího traktu nastane riziko onemocnění lidí salmonelou nebo kamylobakteriosou.

Cílem všech výše zmíněných preparátů je **ovlivnění mikroflóry trávicího traktu**. Střevní bakterie představují širokou škálu většinou striktně anaerobních nebo fakultativně anaerobních druhů. Počty mikroorganismů jsou nejvyšší v kaudálních částech, kde dosahují hodnot až 11 logCFU v jednom gramu tráveniny. Zatím bylo z tohoto prostředí izolováno na 500 různých druhů (Conway, 1997). Celkové počty bakterií v trávicím traktu různých živočišných druhů uvádí tabulka č.1.

**Tabulka 1:** přibližné počty bakterií (v logCFU/g) v různých částech trávicího traktu různých živočišných druhů (podle Hill, 1995)

	Člověk	Potkan	Prase	Myš	Králík
Ústní dutina	7-8	7-8	7-8	7-8	7-8
Žaludek	<3	7	6-7	7	4
Jejunum	<3	7	8	7	4
Ileum	5	8	10	8	8
Tlusté střevo	11	11	11	11	11

CFU = colony forming units

V místech s největší koncentrací mikroorganismů tj. v tlustém a slepém střevě převládají bakterie rodů *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* a *Bifidobacterium*. V menší míře se potom vyskytují enterokoky, koliformní bakterie, laktobacily a klostridie (Kasper, 2001). Střevní mikroorganismy mají řadu fyziologických funkcí a účinků, kterými ovlivňují svého hostitele. Mezi pozitivní funkce patří ochrana proti patogenům formou tzv. kolonizační rezistence, produkce některých vitamínů (hlavně B a K), podíl na trávení potravy (důležitý zejména u přežvýkavců), produkce látek pro výživu enterocytů (kyselina máselná) a imunostimulační funkce. Existují však i účinky opačné pro hostitele do různé míry škodlivé jako je produkce tělesných pachů, produkce toxických látek (např. amoniak), zpětné uvolňování jedů detoxikovaných v játrech a vyloučených žlučí (např. pomocí bakteriální  $\beta$ -glukuronidázy) a kompetice o živiny.

Trávicí trakt u plodu před porodem je prakticky sterilní. Kolonizace střev mikroorganismy začíná během porodu, přičemž hlavním zdrojem infekce je matka. Dalšími faktory ovlivňujícími rozvoj specifických skupin bakterií v trávicím traktu je způsob porodu, styk s matkou, způsob výživy odstav a další. Mezi jednotlivými hospodářskými zvířaty v tomto

ohledu existují velké rozdíly, zatímco např. selata mají zpravidla s matkou těsný kontakt po delší dobu, telata jsou často brzy po porodu separována a extrémním příkladem jsou kuřata, která nemají s rodiči žádný kontakt.

Obecně lze říci, že možnosti ovlivnění mikroflóry trávicího traktu jsou největší u mláďat a to co nejdříve po narození. Použití jak probiotik tak prebiotik k těmto účelům má své dílčí výhody a nevýhody. Historie použití probiotik je delší a sahá do poloviny minulého století, zatímco prebiotika jsou záležitostí zhruba posledních dvou desetiletí. Přesto, jak se zdá dosáhly prebiotika poněkud větší popularity. Jejich výhodou je fakt, že se jedná o chemické látky s větší odolností a trvanlivostí během skladování. Probiotika jsou naproti tomu živé kultury, často citlivé na různé fyzikálně-chemické vlivy a navíc jejich použití musí předcházet složité schvalovací procedury (Von Wright, 2005). Na druhé straně kritickým bodem použití prebiotik je otázka zda dojde k podpoře specifické cílové skupiny bakterií jako jsou bifidobakterie, nebo laktobacily, při jejichž absenci (např. u kojenců porozených císařským řezem, nebo u jednodenních kuřat) jsou účinky těchto látek někdy dokonce negativní, neboť mohou působit flatulenci a průjemy (Gilliland, 2001).

## **Probiotika**

### **➤ Definice a historie používání**

Termín probiotikum poprvé použili Lilly a Stillwell v roce 1965. Označili tak látku produkovanou jedním prvokem, která stimulovala růst jiného prvoka. Později byl tento termín používán pro krmné doplňky hospodářským zvířatům. Pojem zahrnoval buď živé kultury bakterií (Tortuero, 1973), nebo kromě živých většinou bakteriálních kultur i určité substance jako mikrobiální metabolity, enzymy, aminokyseliny apod. (Parker, 1974; Mičan, 1985), pozitivně ovlivňující mikroflóru trávicího traktu. Tato definice by tedy zahrnovala i krmná antibiotika. Sémantický význam slova „probiotikum však znamená „pro život“ a je tedy pravým opakem slova antibiotikum. Proto byla po řadu let přijímána jako nejvýstižnější definice podle Fullera (1989): „**Probiotika jsou živé mikrobiální krmné doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenoty**“. Tato definice klade důraz na použití živých buněk a podle autora odstraňuje zmatek, který vytvářelo slovo „substance“. Dále formulace „příznivě ovlivňuje hostitele“ v sobě zahrnuje všechny pozitivní vlivy – to znamená zlepšení růstu, využitelnost krmiv, vliv na zdravotní stav apod., které byly v předchozích definicích složitě rozepisovány. Definice byla později zjednodušena a v současné době platí formulace vytvořená tzv. „Pracovní skupinou evropských vědců“, která



říká že probiotika jsou „**živé mikrobiální krmné přídatky, které jsou prospěšné pro zdraví**“ (Salminen a kol., 1998). O vymezení pojmu se však vede stále diskuze a někteří výzkumníci opozorňují, že z definice by mohlo (mělo) vypadnout slovo „živý“ a to proto, že pozitivní vliv na zdraví (hlavně při pokusech na lidech) měly také inaktivované buňky mikroorganismů, nebo jen části buněčných struktur hlavně bakterií a kvasinek (Ouweland a kol., 2002).

Při popisu historie používání probiotik je obvyklé jako první bod uvést jméno Ilji Mečnikova (1907), který jako první poukázal na příznivé účinky jogurtových bakterií na lidské zdraví a spatřoval v tom důvod k dlouhověkosti lidí na Balkáně. Ačkoliv první pokusy na zvířatech v tomto ohledu byly uskutečněny ještě před druhou světovou válkou, hlavní rozvoj používání probiotik nastal v šedesátých a sedmdesátých letech dvacátého století. Hlavními používanými mikroorganismy byly zprvu bakterie mléčného kvašení (BMK), zejména laktobacily. Určitým přelomem bylo zavedení směsných, často nedefinovaných kultur, které se osvědčily při prevenci salmoneloz u kuřat (Nurmi a Rantala, 1973). Tato metoda byla zprvu pojmenována jako „Nurmiho koncepce“ je nyní známa spíše pod pojmem „Competitive exclusion“ (CE). Od sedmdesátých let jsou dostupné komerční probiotické založené na čistých kulturách BMK. Od osmdesátých let se objevují i komerční CE kultury (Scheitz a kol., 1991). V poslední době potom dochází ke kombinaci probiotik a prebiotik a to hlavně u drůbeže (Paterson a kol., 1997).

### ➤ *Mikroorganismy používané jako probiotika*

Jak v minulosti, tak i v současné době se jako probiotik používá BMK a to hlavně rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Lactococcus*. Příčiny jsou nejméně tři:

- a) Dlouhodobá zkušenost s těmito bakteriemi při zpracování mléka, výrobě nakládané zeleniny a siláže.
- b) Relativně snadná kultivace (např. na rozdíl od striktních anaerobů).
- c) Jsou v drtivé většině nepathogenní.

Protože se však v poslední době zdůrazňují i další kritéria pro úspěšnou kolonizaci trávicí trubice mikroorganismy, jako jsou například schopnost adherence na střevní epithel, růstové schopnosti v dietě a chymu, odolnost vůči kyselinám a žluči, nebo antagonistické působení proti jiným (pathogenním) bakteriím (Fuller 1989; Gilliland 2001), rozšiřuje se spektrum používaných mikroorganismů. Tabulka č. 2 uvádí přehled používaných mikroorganismů.

**Tabulka 2:** Mikroorganismy používané jako probiotika (upraveno podle Fuller 1989; Voříšek 1989; Ouwehand a kol., 2002; Fooks a Gibson, 2002)

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

Na místo původně používaných mlékárenských kultur se nyní upřednostňují bakterie izolované z trávicího traktu. Za zmínku stojí zejména rod *Bifidobacterium*. Tyto bakterie se pravidelně vyskytují v tlustém střevě lidí a zvířat a byly izolovány také z bachoru a výkalového vaku včely medonosné (Scardovi, 1986; Rada a Petr, 2002). U lidí převažují druhy *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. adolescentis*, zatímco ze zvířat bývá často izolován druh *B. animalis*, který se pro dobré technologické vlastnosti používá i do mléčných kysaných výrobků (Vlková a kol., 2004). Bifidobakterie jsou téměř ideální probiotické bakterie, protože jsou v podstatě nepathogenní, jsou to typické střevní mikroorganismy, u kterých jsou navíc doloženy prokazatelné pozitivní efekty na zdravotní stav lidí a zvířat (Mitsuoka, 1992). Určitým problémem je jejich citlivost na vnější podmínky, neboť se jedná o striktně anaerobní bakterie (Scardovi, 1986).

Dále se používají tzv. polyvalentní preparáty, které obsahují dva až několik desítek bakteriálních druhů (Scheitz a kol., 1981; Goren a kol., 1984). Extrémním je tzv. Nurmiho koncepce (Nurmi a Rantala, 1973), dnes označovaná jako competitive exclusion (CE), kdy se jednodenním kuřatům aplikuje *per os* mikrobiálně nedefinovaný střevní obsah (většinou obsah slepých střev) zdravých, dospělých zvířat. Kromě bakterií byly zejména u přežvýkavců vyzkoušeny kvasinky a některé plísně. Určité kmeny *Saccharomyces cerevisiae* příznivě působily na rozvoj bachorové celulolytické mikroflóry (Dawson a kol., 1990; Williams 1991). Často se také používají kombinace probiotik s dalšími látkami jako např. s enzymy, peptidy, vitamíny a elektrolyty. Přehled některých probiotických preparátů uvádí tabulka č.3.

**Tabulka 3:** Některé probiotické preparáty dostupné v ČR (Anonym1)

Kategorie zvířat	Název	Probiotický mikroorganismus
Drůbež, prasata, skot	LBS ME 10	<i>Enterococcus faecium</i>
Drůbež, prasata, skot	Toyocerin	<i>Bacillus toyoi</i>
Selata, prasata	Ergomyces	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Skot, prasata, drůbež	Yea-Sacc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Drůbež, telata, selata, prasata	Lactiferm	<i>Enterococcus faecium</i>
Dojnice, skot, králíci	Levucell SC 20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

#### ➤ **Testování probiotických mikroorganismů**

Fuller (1989) uvádí pět vlastností důležitých pro dobré probiotické mikroorganismy:

- Daný mikroorganismus by měl být schopen pozitivně ovlivňovat svého hostitele tj. zlepšením růstu, nebo ochranou proti onemocněním.
- Musí být nepathogenní.
- Měl by být přítomen v živé formě, lépe ve velkém počtu, ačkoliv neznáme minimální efektivní dávku.
- Měl by být schopný přežívat a vyvíjet metabolickou aktivitu ve střevě, to znamená, že by měl být odolný proti nízkému pH a organickým kyselinám.
- Měl by být stabilní a přežívat po dlouhou dobu při skladování za běžných podmínek.

Pro výše uvedené požadavky většina autorů uvádí, že probiotika by měla obsahovat normální obyvatele trávicího traktu, nejlépe izolované ze stejného živočišného druhu, kterému jsou aplikována a měla by pocházet od zdravých dospělých jedinců (Jeven a kol., 1991; Gilliland, 2001). Dodržení druhové specifity je důležité například proto, že schopnost adheze bakterií na střevní stěnu je často též druhově specifická.

Jako probiotika se v minulosti nejvíce používaly různé kultury BMK, které byly vybrány pro svoji nepochybnost a snadnou manipulovatelnost. S postupem času se ukázalo, že větší šance na dosažení pozitivního účinku probiotik je v případě, že aplikované kultury jsou schopny přežít v trávicím traktu. Proto byly vyvinuty četné testy *in vitro* pro selekci vhodných kmenů. Otázkou však zůstává jejich korespondence s chováním bakterií *in vivo* (Fuller a Cole, 1988). Tyto laboratorní testy sledují dva cíle:

- a) Snaží se selektovat bakterie schopné ve střevě přežít. Sem patří testy rezistence na žluč, žaludeční kyseliny, měření růstové rychlosti a testy adherence na střevní epitel. Prvotním předpokladem je dodržení zásady, že nejlépe se uplatní bakterie, které byly izolovány ze stejného druhu, kterému jsou podávány.
- b) Snaží se selektovat bakterie s žádanými účinky na hostitele jako např. ochrana proti infekcím, zlepšení trávení apod. Sem patří testy zjišťující antagonistické schopnosti proti určitým patogenům a schopnost ovlivňovat enzymovou aktivitu jiných bakterií ve střevě.

I když oba cíle do jisté míry spolu souvisejí, je zajištění schopnosti přežít prvořadým předpokladem pro dosažení kýženého účinku. Z tohoto pohledu je třeba se zaměřit především na vzájemnou korespondenci testů *in vitro* a *in vivo*.

V poslední době se razí pojem **funkčnost probiotik** jako výsledné vlastnosti vyjadřující efektivní účinky a použitelnost konkrétního výrobku – probiotika (Mattila-Sandholm, a kol., 2002). Funkčnost probiotik je ovlivňována řadou faktorů jako je za prvé charakteristika použitých kmenů, charakter použité potraviny, nebo krmiva, denní dávkou a stabilitou produktu. Za druhé potom jsou to faktory působící při výrobě probiotik jako jsou použité kultivační technologie, technologie použité pro konzervaci kmenů (mražení, sušení lyofilizace) a mikroenkapsulace.

Jak již bylo výše zmíněno, vlastnosti používaných, nebo selektovaných kmenů lze zjišťovat pomocí *in vitro* testů. Podle Gililanda (2001) a Mattila-Sandholm a kol. (2002) lze testovat funkčnost probiotik pomocí dvou okruhů testů. Prvním jsou testy zaměřené na fyziologické (někdy se uvádí termín hygienicko-zdravotní) vlastnosti, kam patří:

- a) Tolerance vůči kyselému prostředí a žaludečním šťávám.
- b) Tolerance na žluč, popř. žlučové kyseliny (což je důležité pro přežívání v tenkém střevě).
- c) Adherence na střevní epitel a přežívání v trávicím traktu.
- d) Immunostimulační, avšak ne prozánětlivé účinky

- e) Antagonistické účinky proti pathogenním bakteriím (u lidí se uvádí hlavně *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* a *Clostridium difficile*; u zvířat potom připadá v úvahu zejména *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. a *Escherichia coli* O157:H7)
- f) Antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti (které jsou důležité hlavně u probiotik určených pro lidskou výživu).

Druhým okruhem testů při nichž se zjišťují technologické vlastnosti probiotických mikroorganismů, kam patří:

- a) Dobré senzorycké vlastnosti
- b) Rezistence vůči fágům
- c) Životaschopnost během procesu výroby
- d) Stabilita v produktu během skladování

Nutno říci, že u výrobců probiotik je často kladen důraz na technologické vlastnosti a fyziologické účinky tedy možné *in vivo* účinky jsou opomíjeny. Uvedme dva příklady. Do probiotik pro hospodářská zvířata se často přidává *Enterococcus faecium* M74, což je bakterie původně izolovaná z výkalů lidských kojenců. O přežívání této bakterie v trávicím traktu zvířat nejsou přesvědčivé důkazy, avšak je jisté, že tento kmen má výborné technologické vlastnosti např. dobře snáší lyofilizaci a přežívá po dlouhou dobu v probiotických preparátech a to ve velmi vysokých počtech. Druhým příkladem do určité míry opačným je použití *Bifidobacterium animalis* (známé jsou kmeny BB12 a „Bifidus esencis“ od Danone) do mléčných kysaných výrobků. Zde se naopak jedná o použití pravděpodobně animálních kmenů (přesný původ kmenů znají jen výrobci) do lidských potravin. Důvodem jsou opět jednoznačně lepší technologické vlastnosti *B. animalis* oproti lidským kmenům bifidobakterií a to hlavně schopnost přežít během skladování.

### ➤ **Aplikace probiotik**

Při volbě způsobu aplikace je třeba přihlížet k mnoha faktorům jako je věk a druh zvířete, způsob krmení a ustájení. Je třeba se zabývat i otázkou výše účinné dávky. Při výběru vlastního probiotika potom je třeba přihlížet k vlastnímu způsobu aplikace (krmivem, pitnou vodou, individuální aplikace) a v neposlední řadě ne možné interakce mezi probiotiky a komponenty krmiva (Ewing a Cole, 1994). Je možno také volit mezi preparáty monovalentními a polyvalentními (Timmerman a kol., 2004).

Co se týká **výběru vhodného kmene**, přehled používaných kmenů je v kapitole 2.2. Bakterie vhodné určité kategorie budou popsány ve speciálních kapitolách, zde jen stručně shrneme, že jako probiotika by se měly používat mikroorganismy vlastní určitému živočišnému druhu a které se v trávicím traktu přirozeně vyskytují ve vysokých počtech. Pro lidské kojenče je proto nejvíce přirozenější použití bifidobakterií, zatímco pro mladou drůbež a selata se zdají být efektivní laktobacily. BMK připadají v úvahu i pro telata v období mléčné výživy. U dospělých přežvýkavců existuje velice komplikovaný mikrobiální ekosystém v batoru, který není příliš ovlivnitelný probiotiky. Do určité míry zde příznivě fungují některé kmeny kvasinek a snad i bakterie ze siláží (Weinberg a kol., 2004).

Vlastní **způsoby aplikace probiotik** mohou být následující (Fuller, 1992; Ewing a Cole, 1994):

- lyofilizovaný prášek
- v pitné vodě
- ve formě pasty
- aerosol

Nejčastější formou jsou lyofilizované prášky. Obvyklá dávka je 0,1-1 kg na 1 tunu krmné směsi (Ewing a Cole, 1994, Anonym 1, 2000). Důležitý je obsah živých buněk, např. nejčastěji používané probioticum ve Velké Británii je Lacto-Sacc (Ewing a Cole, 1994), které obsahuje 100 milionů CFU/g *Lactobacillus acidophilus* a 70 milionů CFU/g *Enterococcus faecium*. Výsledná koncentrace živých buněk by měla být  $10^5$  až  $10^6$  na 1 gram krmné směsi. Přehled některých probiotických preparátů dostupných v ČR a jejich dávkování uvádí tabulka č. 4.

**Tabulka 4:** Dávkování některých probiotických preparátů dostupných v ČR (Anonym 1):

	Kategorie zvířat	Dávkování (g/t)	Cena v Kč při dávce	
			1%	0,5%
Toyocerin	Telata	100	44	-
	Selata	50 - 100	22 - 44	11 - 22
	Brojleři	50	22	11
Yea-Sacc	Telata	1000	52	-
	Dojnice	1000	52	-
	Selata	2000	104	-
LBC ME 10	Telata	35 - 70	21,40 - 42,80	10,70 - 21,40
	Selata	35 - 70	21,40 - 42,80	10,70 - 21,40
	Drůbež	20 - 35	12,20 - 21,40	6,10 - 10,70
Levucell SC 20	Skot	50	33,60	-
	Koně, ovce	50	33,60	-
	Králíci	50	-	16,80

Ohledně **věku** je aplikace probiotik zvláště účinná u mladých zvířat např. u telat (Rosell, 1987), kuřat (Wiseman, 1990) a selat (Cole, 1991). Novorozená zvířata mají prakticky sterilní trávicí trakt, a proto je u nich pravděpodobnost kolonizace probiotickými mikroorganismy největší. Extrémním příkladem v tomto směru jsou čerstvě vylíhnutá kuřata, která nemají žádný kontakt s rodiči a mikroorganismy se do jejich trávicího traktu dostávají z vnějšího prostředí. Při našich pokusech s jednodenními kuřecími brojlery byly testovány celkem čtyři různé formy aplikace bakterie *Lactobacillus salivarius* (Rada a kol., 1995): nativní kultura aplikovaná individuálně *per os*, nativní kultura v pitné vodě, lyofilizovaná kultura v pitné vodě a lyofilizovaná kultura v krmivu. Všechny způsoby podávání vedly k rychlé kolonizaci trávicího traktu probiotickou bakterií s následným poklesem koliformních bakterií, které jsou hlavní příčinou úhynů kuřat na nespecifické septikémie v průběhu prvního týdne života. Důvody úspěšné kolonizace trávicího traktu byly dva: za prvé byla použita jednodenní kuřata bez vyvinuté vlastní střevní mikroflóry, za druhé byl použit pro drůbež vlastní kmen *Lactobacillus salivarius*. Při selekci tohoto kmene se ukázala jako nejdůležitější jeho schopnost růst ve zvlhčené krmné směsi (což simulovalo prostředí volete). U prasat byla prokázána nižší mortalita selat porozených prasnicemi, které byly před porodem krmeny směsí s přídatkem bakterií mléčného kvašení (Cole a kol., 1992).

#### ➤ **Mechanismus účinku probiotik**

Probiotikům jsou připisovány rozličné účinky, v praxi je snaha podáváním těchto látek zlepšit buď užitkovost, nebo zdravotní stav hospodářských zvířat. Jako možné účinky probiotik uvádí Fuller (1997):

- větší odolnost proti infekčním onemocněním
- zvýšení růstových vlastností
- zlepšení konverze krmiv
- lepší trávení potravy
- lepší vstřebávání živin
- poskytnutí esenciálních živin
- zvýšení produkce a kvality mléka
- zvýšení produkce a kvality vajec
- zvýšení kvality jatečně opracovaného masa

Účinky na zdravotní stav se zdají být více prokazatelné a fungují zejména u mladých zvířat a ve špatných hygienických podmínkách chovu a ustájení. Je zajímavé, že zlepšení

zdravotního stavu (např. snížení úhynu u kuřat, nebo pokles frekvence průjmů u selat) je často doprovázen snížením přírůstků na živé hmotnosti. Důvodem může být pokles pH v tenkém střevě následkem produkce kyseliny mléčné probiotickými bakteriemi, což vede ke snížené aktivitě proteolytických enzymů (Fuller, 1992). Pravděpodobně nelze tedy od probiotik čekat univerzální příznivé efekty, které by zároveň zlepšovaly jak zdravotní stav, tak užitečnost.

### ➤ *Probiotika pro drůbež*

Intestinální mikroflóra drůbeže je poměrně dobře zmapována. Trávicí trakt ptáků má tři zvláštnosti oproti ostatním všežravým živočichům. Je to vakovité vychlípení hltnu – vole, dále dva žaludky – žlaznatý a svalnatý a konečně dvě slepá střeva.

**Vole** je zásobní orgán, který slouží k uchování potravy, která je zde zvlhčena přijatou vodou a slinami. Nejsou zde přítomny žádné endogenní enzymy. Celkové počty bakterií ve voleti se blíží hodnotě 9 log CFU/g. Dominují laktobacily hlavně *Lactobacillus salivarius*, dále *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus reuteri* v počtech 8-9 log CFU/g (Mead, 1997). Ve voleti je proto hlavním mikrobiálním metabolitem kyselina mléčná a to v koncentraci 100-180 mmol/l (Rada a Marounek, 1996). V **žaludcích** počet mikroorganismů klesá. Dominují stále laktobacily, které se hojně vyskytují i v **tenkém střevě**, kde postupně počet bakterií stoupá kaudálním směrem, někdy se objevují tzv. segmentované filamentosní bakterie (Pearson a kol., 1992). Dále se vyskytují enterokoky a koliformní bakterie. V dolní části tenkého střeva se objevují striktně anaerobní bakterie rodů *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Gemmiger* a *Fusobacterium* (Mead, 1997). Místem s největším výskytem bakterií jsou **slepá střeva**, kde celkový počet mikroorganismů dosahuje hodnot až 11 log CFU/g. Vyskytují se tam grampozitivní anaerobní koky jako jsou např. peptostreptokoky, které tvoří až 30 %. Dalšími významnými bakteriemi (20 %) jsou gramnegativní nesporulující rody čeledi *Bacteriodaceae* zahrnující rody *Bacteroides* a *Megamonas*. Grampozitivní nesporulující tyčinky (*Eubacterium*) dosahují 16 %, pučící bakterie *Gemmiger* a pučící koky tvoří 10 % stejně jako klostridie a bifidobakterie (Barrow, 1992). Ve slepých střevech dospělé drůbeže se vyskytují i metanové bakterie (Miller a kol., 1986).

Mikroflóra trávicího traktu je ovlivňována především věkem a složením krmiva. Normální složení bakterií ve slepých střevech se ustálí za zhruba 4-6 týdnů (Mead, 1989), metanové bakterie se však objeví až za tři měsíce (Marounek a Rada., 1998). Složení krmiva může ovlivnit hlavně proximální části trávicího traktu, zatímco caeca jsou málo ovlivnitelná. Zvýšení obsahu snadno zkvasitelných cukrů vede ke zvýšení počtu laktobacilů, zatímco dieta



obohacená o proteiny jejich počty snižuje na úkor koliformních bakterií a klostridií (Barrow, 1992).

Jednodenní kuřata jsou ideálním objektem pro aplikaci probiotik, neboť se rodí prakticky sterilní a nemají žádný kontakt s rodiči. Nejvhodnějšími probiotickými bakteriemi jsou laktobacily, nejlépe pocházející z trávicího traktu drůbeže. Morishita a kol. (1971) zjistili, že zatímco drůbeží kmeny *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius* a *L. fermentum* dobře kolonizovaly trávicí trakt jednodenních kuřat, lidský kmen *L. acidophilus*, *L. helveticus* a *L. brevis* byly rychle z trávicího traktu eliminovány. Při selekci vhodných kmenů se osvědčily *in vitro* testy na přežívání v kyselém pH, růst ve zvlhčeném krmivu a adherence na střevní epitel (Fuller 1992; Rada a kol., 1995). Velké množství pokusů, při nichž byly aplikovány bakterie mléčného kvašení, hlavně laktobacily, bylo provedeno zejména na hrabavé drůbeži. Výsledky jsou však velmi variabilní. Výsledky lze shrnout do následujících bodů (Barrow, 1992; Fuller 1992; 1997):

- Nejúčinnější jsou laktobacily (hlavně *L. salivarius*) drůbežního původu.
- Lepší kolonizace trávicího traktu byly dosažena u jednodenních kuřat, u nosnic jsou výsledky horší.
- Účinky na zdravotní stav se dostavily hlavně u mladých kuřat a byly největší u zvířat chovaných ve špatných hygienických podmínkách.
- Účinky na užitkovost (kvalita vajec, snáška, přírůstek na váze) nejsou konzistentní a prokazatelné.

Je nutno uvést, že v ojedinělých případech, resp. u některých kmenů, laktobacily při aplikaci kuřatům projevily negativní účinky. Obecně se nepříznivé účinky projevily při vysokých dávkách specifických kultur. Watkins a Kratzer (1983) uvádějí, že dávky 7 log CFU buněk *Lactobacillus* sp. na kuře a den mohou působit depresi růstu. Negativní účinky byly pozorovány hlavně u laktobacilů a jsou vesměs přičítány nadměrné tvorbě kyselin popř. tvorbě D- kyseliny mléčné (Szyliet a Nugon-Baudon, 1985). Dokonce byl popsán i kmen *Lactobacillus acidophilus*, který vyvolával u bezmikrobních kuřat zdravotní obtíže s vysokou mortalitou (Champ, 1983).

Častým problémem při produkci drůbežního masa a vajec jsou salmonelasy. Jako prevence se ukázala být účinná metoda „competitive exclusion“ (CE). Při CE je využit fakt, že jednodenní kuřata jsou daleko více citlivá na střevní infekce, než dospělá drůbež a to vzhledem k absenci komplexní mikroflóry hlavně ve slepých střevech. Tato metoda byla poprvé použita ve Finsku (Nurmi a Rantala, 1973) a spočívala v aplikaci střevního obsahu

zdravých dospělých jedinců jednodenním kuřatům. Výsledky jsou velice slibné a účinek daleko prokazatelnější v porovnání s aplikací čistých kultur BMK. Určitým nedostatkem je nemožnost zajištění rovnoměrné kvality podávaného materiálu a jeho praktická nedefinovatelnost. Přesto zájem o „Nurmiho koncepci“, později přejmenovanou na CE dále vzrůstal a v na přelomu osmdesátých a devadesátých let minulého století se na trhu objevily i komerční preparáty, např. BROILAK fy. Orion Corporation Farmos. Uvedený preparát sice nezlepšil růstové vlastnosti kuřecích brojlerů, ale evidentně urychloval eliminaci salmonel ze slepých střev (Scheitz a kol., 1991). Zvláště účinná se jeví kombinace CE s přidavkem laktosy (Hinton a kol., 1991). Předpokládáný mechanismus účinku je snižování pH střevního obsahu s následnou tvorbou nedisociovaných forem kyseliny mléčné a těkavých mastných kyselin, uvažuje se i o inhibici adheze salmonel na střevní stěnu (Ziprin a kol., 1991; Leffler a kol., 1989).

#### ➤ **Probiotika pro prasata**

Prasata jsou monogastrická zvířata, u nichž jsou v sách proximální části trávicího traktu (žaludek, tenké střevo) relativně bohatě osídleny mikroorganismy. Dominují zde BMK hlavně laktobacily a enterokoky v počtech okolo 7 log CFU/g. Laktobacily se nalézají hlavně na nesecernující části žaludku, kde tvoří souvislý povlak (Fuller, 1978). Podobně v tenkém střevě dochází k adhezi těchto bakterií na střevní stěnu (McAllister a kol., 1979). Rozvoj BMK usnadňuje relativně vyšší pH v žaludku, odkud inokulují tenké střevo, kde počty bakterií dosahují až 9 log CFU/g (Jonsson a Conway, 1992). Největší počty bakterií jsou jako obvykle v tlustém a slepém střevu – až 11 log CFU/g. Je zajímavé, že zatímco slepému střevu dominují gramnegativní bakterie, tak v tlustém jsou početnější grampozitivní bakterie (Robinson a kol., 1981; Salanitro a kol., 1977). Dominují hlavně rody *Lactobacillus*, *Bacteroides* a *Clostridium* (Jonsson a Conway, 1992). Bifidobakterie se vyskytují pravidelně, avšak v poměrně nízkých počtech (Mikkelsen a kol., 2003). Podílí se na celkové mikroflóře jen setinami procenta.

Jako probiotika se pro prasata používají různé mikroorganismy, podobně jako pro drůbež se nejčastěji používají především laktobacily a dále ostatní BMK a to jak druhy, které jsou indigenní pro prasata (*Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *E. faecium* a *E. faecalis*), tak druhy pro prasata neindigenní (*L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*), které jsou používány ke konzervaci krmiv a potravin (Jonsson a Conway, 1992). V porovnání s drůbeží je výčet použitých monokultur pestřejší a rozličné jsou i způsoby aplikace. Byly použity i bifidobakterie (Kimura a kol.,

1983; Ervolder a kol., 1984). Jejich použití a efektivita je diskutabilní, protože tyto bakterie nemají v trávicím traktu prasat dominantní úlohu. Dále se ve větší míře používaly sporující bakterie *Bacillus subtilis* a *B. toyoi* a dále *Clostridium butyricum* (Han a kol., 1984). Bacily ve formě spor jsou snadno skladovatelné, ale jejich účinnost *in vivo* je sporná. Zajímavé by mohlo naopak být použití klostridií, které patří k indigenní mikroflóře prasat a produkují butyrát nezbytný pro výživu enterocytů. Problémem je však patogenita klostridií a nedostatek konzistentních, experimenty potvrzených pozitivních účinků.

U selat jsou vážným problémem průjmová onemocnění způsobená patogenními kmeny *E. coli*. Jako prevence se ukázalo použití nepochybných *E. coli* (Davidson a Hirsch, 1976; Duval-Iflah a kol., 1983) a dokonce použití fágů, které se specificky vážaly na K-antigeny (Smith a Huggins, 1983). Účinky v obou případech byly úzce specifické a tudíž nepůsobí jako dostatečně účinná prevence průjmů vhodná pro praktické použití.

Různé jsou i formy podávání probiotik prasatům, mléčné bakterie lze podávat formou lyofilizovaných prášků, fermentovaného mléka, ale i fermentované zvlhčené krmné směsi. Enterokoky byly podávány většinou jako lyofilizované prášky. U prasat se také používalo individuální dávkování a to u selat (Jonsson a Conway, 1992). Bylo také vyzkoušeno podávání probiotik prasnicím těsně před porodem s cílem následného přenosu na selata (Cole, 1992).

Výsledky použití probiotik pro prasata můžeme shrnout do následujících bodů:

- Jako nejvhodnější probiotické bakterie se jeví laktobacily pocházející z trávicího traktu prasat, a to protože tyto bakterie jsou dominantní složkou přirozené mikroflóry prasat.
- Použití bifidobakterií, které jsou v současné době pravděpodobně nejpobulárnějšími probiotickými bakteriemi není u prasat vhodné, protože bifidobakterie nehrají ve střevní mikroflóře prasat podstatnou úlohu.
- Nejvhodnější kategorií zvířat pro aplikaci probiotik jsou selata, avšak účinky nejsou, tak pronikavé jako u drůbeže. Selata mají poměrně těsný kontakt s matkou a ta je pro ně nejvýznamnějším zdrojem mikroorganismů.
- Jako perspektivní se zdá být zkrmování fermentované zvlhčené směsi (možná náhrada krmných antibiotik).

### ➤ *Probiotika pro přežvýkavce*

Anatomie a fyziologie trávicího traktu je značně odlišná oproti monogastrickým zvířatům. Hlavním rozdílem je existence předžaludků, z nichž nejdůležitější je první – bachor, který má u dospělého jedince skotu objem 60-100 (výjimečně až 200) l. Bachor obsahuje až 11 log CFU/g živých mikroorganismů. Přítomna je široká škála prokaryotických a eukaryotických organismů. Hlavní skupinou jsou bakterie v počtech 10-11 log CFU/g, dále prvoci 5-6 log CFU/g, vyskytují se i anaerobní houby a fágy (Wallace a Newbold, 1992). Kvasinky se v bachoru rovněž přirozeně vyskytují, ale pravděpodobně jen jako transienti v nízké koncentraci okolo 3 log CFU/g (Lund, 1974). Nejvýznamnějšími mikroorganismy jsou fibrolytické bakterie mezi hlavní paří celulólytické gramnegativní bakterie *Fibrobacter succinogenes* a dva druhy grampozitivních bakterií *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*. Na rozkladu vlákniny se podílejí i xylanolytické bakterie *Prevotella* sp. a *Butyrivibrio fibrisolvens*. Mezi méně prozkoumané celulólytické bakterie patří například *Eubacterium cellulosolvens* (Krause a kol., 2003). Podle posledních prací mají při rozkladu vlákniny velký význam i anaerobní houby, hlavními rody jsou *Neocallimastix* a *Piromyces* (Krause a kol., 2003). Navíc xylanolytická aktivita byla identifikována i u prvoků (Devillard a kol., 2003). Fibrolytické bakterie mají většinou i pektinolytickou aktivitu. Zásobní polysacharidy jako je škrob rozkládá například *Streptococcus bovis*. V bachoru se pravidelně vyskytují i metanové bakterie (*Methanomicrobium*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*) které z CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub> tvoří metan (Hespell a kol., 1997).

Při aplikaci probiotik přežvýkavcům je třeba přihlížet významně k věku zvířat. U mladých zvířat v období mléčné výživy není vyvinut bachor a rovněž složení potravy je jiné, tzn. méně vlákniny, více proteinů a snadno zkvasitelných sacharidů. Problémem jsou podobně jako u selat průjmová onemocnění, která se v četných pokusech podařilo eliminovat pomocí aplikace BMK, hlavně *Lactobacillus acidophilus*, další laktobacily a enterokoky z ostatních bakterií potom *Bacillus toyoi* (Wallace a Newbold, 1992). Z telat byly také často izolovány bifidobakterie (Scardovi, 1986), avšak existuje pouze jedna starší práce o aplikaci bifidobakterií telatům (Abe a kol., 1995). Chybí podrobnější studie o kvantitativním výskytu bifidobakterií u telat, podle našich dosud nepublikovaných údajů jsou počty těchto bakterií u mladých přežvýkavců vysoké a dokonce se v tomto směru podobají lidským kojencům.

Mikroflóra bachoru je podstatně hůře ovlivnitelná. Při manipulaci bachorové fermentace se používaly především různé chemické látky, antibiotika (ionofóry), úprava krmné dávky apod. Cílem těchto manipulací bylo (a je) zlepšení trávení vlákniny (např. potlačením

metanogeneze pomocí monensinu a dalších ionofórových antibiotik), snížení degradace proteinu a detoxifikace komponentů krmiv (Weimer, 1998). Probiotická aplikace typických bachorových bakterií je problematická, neboť se jedná o kultivačně velice náročné striktní anaeroby. Byly činěny pokusy s geneticky modifikovanými bakteriemi rodů *Fibrobacter* a *Ruminococcus* s cílem vložit do těchto kultur gen pro produkci exoceluláz, ale bez úspěchu, zatímco částečného úspěchu bylo dosaženo u *B. fibrisolvens* (Krause a kol., 2003). Z probiotických mikroorganismů bylo u skotu dosaženo největších účinků pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, kdy některé kmeny (uvádí se, že účinný byl jeden kmen z tisíce testovaných), působily vzrůst pH bachorové sřávy s následným rozvojem celulolytické mikroflóry (Dawson a kol., 1990; Williams, 1991) a podle posledních údajů také snižují aktivitu peptidáz a degradaci proteinů (Chaucheyras-Durand a kol., 2005).

## **Prebiotika**

### ➤ **Definice a historie používání**

Pro příznivé ovlivnění mikroflóry trávicího traktu je možno zvolit v zásadě dva způsoby. První je *per os* podávání živých kultur mikroorganismů. Většinou jsou používány laktobacily a v poslední době čím dál více bifidobakterie. Protože tyto bakterie patří mezi indigenní obyvatele střev, druhá strategie zvýšení jejich počtů je zásobování ve střevě již přítomných bakterií látkami stimulaujícími jejich růst. Tyto selektivní složky potravy byly v roce 1995 nazvány „prebiotiky“. Prebiotika byla definována jako (Gibson a Roberfroid, 1995): „nestravitelné potravní ingredience, které příznivě ovlivňují hostitele pomocí selektivní stimulace a/nebo aktivitu jedné, nebo omezené skupiny bakterií v tlustém střevě, což může zlepšit zdraví hostitele“.

V podstatě jakákoliv nestrávená živina, která se dostane až do tlustého střeva je potenciálním prebiotikem. Většina látek označovaných jako prebiotika jsou sacharidy, od jednoduchých alkoholických cukrů, přes disacharidy a oligosacharidy až po polysacharidy (Rastall a Gibson, 2002). V následujících kapitolách budou popsány nejdůležitější a nejčastěji používané látky tohoto charakteru.

### ➤ **Fruktooligosacharidy (FOS) a inulin**

FOS a inulin jsou polymery D-fruktosy spojené vazbou  $\beta$ -2-1. Na konci molekuly je většinou pomocí  $\alpha$ -1-2 vazby napojena glukosa. Molekuly se stupněm polymerace větším než 20 bývají označovány jako inulin. Inulin a FOS jsou přítomny v řadě potravin rostlinného

původu jako je čekanka, cibule, česnek, chřest, rajčata a banány (Crittenden a Playne, 1996). FOS se také vyrábějí enzymatickou hydrolýzou inulinu (většinou z kořene čekanky), možný je však i opačný postup tj. syntéza ze sacharosy (Tuohy a kol., 2005). Jak FOS tak inulin mají výrazné, v mnohých *in vitro* a *in vivo* pokusech prokázány, bifidogenní účinek (Roberfroid, 1997).

#### ➤ **Laktulosa**

Laktulosa je disacharid, který vzniká izomerací laktosy např. tepelným ošetřením mléka. Chemicky je to „4-O-β-galactopyranosyl-D-fructose“. Je to látka původně používaná jako projímadlo ve veterinární a humánní medicíně (Crittenden, 1999). Bifidogenní účinky jsou četně dokumentovány na lidech a laboratorních zvířatech, hlavně potkanech (Tuohy a kol., 2005), avšak nikoliv na hospodářských zvířatech.

#### ➤ **Galaktooligosacharidy (GOS) a sojové oligosacharidy (SOS)**

Galaktooligosacharidy jsou definovány vzorcem  $\text{Glu}\alpha 1-4[\beta\text{Gal}1-6]_n$  kde  $n=2-5$ . Jsou přítomny v lidském a kravském mléce (Tuohy a kol., 2005). Bifidogenní účinky jsou dobře zdokumentovány na laboratorních zvířatech, včetně „human flora associated“ (HFA) potkanech a lidech (Tuohy a kol., 2005). Jsou také přidávány do umělé výživy pro kojence. Galaktooligosacharidy vyráběné z laktosy pomocí transgalaktosylasové aktivity β-galaktosidasy se nazývají transgalaktosylované oligosacharidy (TOS). Mají rovněž bifidogenní účinky u lidí (Crittenden, 1999). V Japonsku se přidávají do tzv. TOS agarů (fy. Yakult) ke kultivaci bifidobakterií v podmínkách *in vitro*.

Velké zastoupení galaktosy je také v sójových oligosacharidech, tyto se vyskytují i v dalších luštěninách a někdy bývají souhrnně označovány jako oligosacharidy rafinosové řady (RSO – raffinose series oligosaccharides). Patří sem hlavně rafinosa (trisacharid, α-D-Gal-(1-6)-α-D-Glu-(1-2)-β-D-Fru), stachyosa (tetrasacharid, α-D-Gal-(1-6)-α-D-Gal-(1-6)-α-D-Glu-(1-2)-β-D-Fru) a verbaskosa (pentasacharid, α-D-Gal-(1-6)-α-D-Gal-(1-6)-α-D-Gal-(1-6)-α-D-Glu-(1-2)-β-D-Fru). RSO byly zprvu (a částečně i dnes) považovány za antinutriční látky, které způsobují flatulenci u lidí. Pozitivní účinky na růst bifidobakterií v tlustém střevě byly podrobně studovány hlavně v Japonsku (Mitsuoka, 1992).

#### ➤ **Isomaltooligosacharidy (IMO)**

Isomaltooligosacharidy se skládají z glukos spojených do řetězce (většinou krátkého, sestávajícího ze 2-4 jednotek) pomocí α-1-6 glykosidické vazby. Komerčně vyráběné

produkty IMO jsou směsi di-, tri- a tetrasacharidů, z nichž všechny mají bifidogenní účinky u lidí, avšak podle některých studií záleží na zastoupení jednotlivých složek, přičemž IMO o nízkých stupních polymerace mohou být tráveny v tenkém střevě (Tuohy a kol., 2005).

#### ➤ *Xylooligosacharidy (XOS)*

Xylooligosacharidy obsahují hlavně molekuly xylosy spojené vzájemně  $\beta$ -1-4 glykosidickými vazbami. Podle některých studií dobře stimulují růst bifidobakterií, avšak při pokusech s lidskými výkaly stimulovaly také množení rodu *Bacteroides* (Rycroft a kol., 2001) na který mají FOS a GOS účinky opačné (Tuohy a kol., 2005).

#### ➤ *Pokusy na zvířatech*

Většina pokusů s prebiotiky byla provedena s laboratorními zvířaty a s lidskými dobrovolníky, zatímco pokusů na hospodářských zvířatech je málo. Je zajímavé, že u probiotik je tomu naopak. Důvodem je za prvé fakt, že probiotika jsou živé organismy a tudíž mohou být pro člověka i potenciálně nebezpečné. Prebiotika jsou chemické, většinou přesně definované látky s minimálními zdravotními riziky navíc dobře skladovatelné. Druhou příčinou velké aktivity výzkumu prebiotik na lidech jsou potenciální fyziologické účinky prebiotik, které kromě bifidogenních účinků mohou také vykazovat další efekty jako jsou (Tuohy a kol., 2005; Crittenden, 1999) vliv na rozvoj nervové soustavy (hlavně u kojenců), prevence rakoviny tlustého střeva, inhibice adherence patogenních bakterií na střevní stěnu a vstřebávání některých prvků ze střeva (např. Ca).

Relativně více pokusů s prebiotiky bylo provedeno u hrabavé drůbeže, a to především v souvislosti s eliminací salmonel. V testech, kde byly porovnávány účinky několika cukrů (Oyofa a kol., 1989), se glukosa, sacharosa a maltosa ukázaly jako neúčinné, zatímco účinná byla laktosa a manosa. U obou cukrů se předpokládá vazba na pili buněk salmonel a tím omezení adheze na střevní epitel. U laktosy se navíc předpokládá stimulační účinek na BMK, protože drůbež nemá endogenní laktázu a laktosa je tudíž pro ní nestravitelným oligosacharidem. U drůbeže byl pozorován i bifidogenní účinek nestravitelných oligosacharidů. Bifidobakterie jsou pravidelnou součástí jak definovaných, tak nedefinovaných kultur používaných pro CE. Růst těchto bakterií je stimulován přítomností oligosacharidů, zejména pak fruktooligosacharidů (Mitsuoka, 1992). Tento jev byl pozorován také u kuřecích brojlerů, kde se rozvoj bifidobakterií dává do souvislosti s potlačením kolonizace slepých střev salmonelami (Chambers, a kol., 1997), účinné se projevíly fruktooligosacharidy, buď jejich směsí (Oyrzabal a Conner, 1995), nebo čistý

fruktooligosacharid (trisacharid) vzniklý termální syntézou ze sacharosy a fruktosy nazývaný kestosa (Paterson a kol., 1997). Celý problém však zaslouží další podrobné studium, protože zejména selektivní stanovení bifidobakterií ve střevním obsahu drůbeže a také u ostatních zvířat není dostatečně metodicky propracováno. Kolonie na použitých agarových prostředích musí být často individuálně mikroskopicky vyšetřovány, aby se potvrdilo zda se opravdu jedná o *Bifidobacterium* sp. (Krause a kol., 1996; Silvi a kol., 1996). Nutno však podotknout, že ani mikroskopické vyšetření nemůže s konečnou platností odlišit bifidobakterie od dalších bakteriálních rodů, u drůbeže se jedná zejména o laktobacily. V poslední době byly testovány také IMO, které v *in vitro* podmínkách stimulovaly drůbeží bifidobakterie na úkor salmonel (Chung a Day, 2004).

Pokusy s prebiotiky proběhly také u prasat, kde GOS zvyšovaly počty bifidobakterií, laktobacilů a koncentraci mastných kyselin s krátkým řetězcem (Smiricky-Tjardes a kol., 2003). Naopak Mikkelsen a kol. (2003), nezjistili žádný stimuláční efekt TOS a FOS na bifidobakterie ve výkalech selat po odstavu, avšak došlo k výraznému zvýšení počtů kvasinek.

V poslední době vzrůstá také zájem o výživu domácích zvířat, hlavně psů a koček. A proto krmiva pro tato zvířata mohou být fortifikována inulinem a oligofruktosou (Hussein a kol., 1999). Bifidogenní a jiné účinky prebiotik však musí být v tomto případě teprve exaktně dokázány.

## **Shrnutí**

Probiotika mají ve výživě zvířat poměrně dlouhou historii (od 70. let minulého století), zatímco prebiotika se používají posledních cca 10 let. Význam těchto látek bude stoupat zejména od r. 2006, kdy vejde v platnost v EU zákaz používání antibiotik ke krmným účelům. Jak probiotika, tak prebiotika jsou v jistém směru vhodnou alternativou. Jejich možnosti však nejsou neomezené a zároveň je třeba zdůraznit, že je třeba pracovat na vývoji nových produktů v této oblasti. Z dosavadních praktických zkušeností a údajů z odborné a vědecké literatury lze vyvodit následující závěry:

- Nejúčinnější použití probiotik je pro mladá zvířata.
- Ideálním objektem pro aplikaci probiotik je mladá drůbež.
- U drůbeže jsou účinné CE kultury jako prevence proti salmonelozám, účinek se zvyšuje prebiotiky.



- Je potřeba izolovat a selektovat nové kmeny probiotických bakterií, které budou specifické pro určité kategorie hospodářských zvířat.
- Účinek nestravitelných oligosacharidů jako prebiotik je dobře dokumentovaný u laboratorních zvířat a člověka. U hospodářských zvířat jsou účinné FOS, u dalších zvířat je třeba účinek prokázat.

## **Možnosti náhrady antibiotik jinými látkami s antimikrobiálním účinkem**

### **➤ *Mannanligosaccharidy***

Použití mannanligosaccharidů patří do souboru metod nazývaných „competitive exclusion“. Jejich účelem je zabránit osídlení trávicího traktu zvířat pathogenními mikroorganismy (Impey a kol., 1982). V literatuře je popsána řada různých bakteriálních kultur, počínaje čistými kulturami bakterií mléčného kvašení, směsnými kulturami těchto bakterií a konče špatně definovanými kulturami odvozenými z faeces nebo obsahu slepého střeva zdravých dospělých zvířat. Princip „competitive exclusion“ spočívá v obsazení receptorů na střevní stěně, což znemožní pathogenním bakteriím adhezi a vede k jejich vyplavení z gastrointestinálního traktu. Zmíněné bakteriální kultury lze nahradit některými jednoduchými cukry, zejména mannosou. Potřebná koncentrace mannosy v krmné směsi je však vysoká, což činí její použití neekonomickým. Výhodnější je použití mannanligosaccharidů (MOS), které působí v nižších koncentracích. Jejich zdrojem jsou buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Alltech). Pokusů s MOS je teď již velký počet. Ukazují, že kromě interakce s povrchem bakteriálních buněk existují i další účinky.

### **➤ *Immunostimulační účinky mannanligosaccharidů***

Další, často zmiňovanou vlastností MOS je stimulace složek imunitního systému (Ohya a kol., 1994). Týká se makrofágů, monocytů i tvorby imunoglobulinů, tj. jak buněčné, tak i humorální složky imunitní odpovědi. MOS působí jako antigen, podléhající endocytose v určitých místech střevního epitelu a vyvolávající odpověď imunitního systému v podslizniční vrstvě (Power, 1997).

### **➤ *Použití mannanligosaccharidů ve výživě zvířat***

Davis a kol. (2004a) přidali fosforylovaný mannan, připravený z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* do krmné směsi selat v množství 0,2 a 0,3%. Pokus současně sledoval účinek zinku (ZnO). Mannan zvýšil přírůstek hmotnosti selat a zlepšil konverzi krmiva. Účinek

mannanu byl menší než účinek Zn. Použití Zn, podobně jako Cu, je však omezeno. Příznivý účinek mannanu na růst selat potvrdili autoři v dalším pokuse (Davis a kol., 2004b). Podrobně zjišťovali účinek mannanu na imunitní systém selat. Mannan působil nejen na jeho střevní část, ale i systemicky.

Spring a kol. (2000) zkoušeli MOS v podmínkách experimentální infekce kuřat salmonelami (*S. typhimurium*). Přídavek MOS v dávce 0,4% krmné směsi snížil koncentraci salmonel v slepých střevech z 5,4 na 4,01 log<sub>10</sub> cfu/g. Neměl vliv na bakterie koliformní ani další skupiny bakterií, rovněž ne na pH a mikrobiální metabolity ve střevním obsahu. Inhibiční účinek MOS na salmonely (*S. enteritidis*) potvrdili Fernandez a kol. (2002). MOS přidali do krmiva slepic v atypicky vysokém množství: 2,5%. V obsahu slepých střev nosnic MOS snížil počty salmonel, koliformních bakterií a enterokoků. Počty bifidobakterií a laktobacilů, tj. bakterií považovaných za zdraví prospěšné, byly zvýšeny. Na další práci (Samarasinghe a kol., 2003) je zajímavé to, že srovnávala MOS s antibiotikem velmi často používaným ve výživě drůbeže - s virginiamycinem. MOS přidali do krmiva kuřat v množství 0,2%. MOS zvýšil hmotnostní přírůstky kuřat o 8,0% (virginiamycin o 8,8%). Obě aditiva redukovala počty koliformních bakterií v duodenu. Autoři považují MOS za dobrou náhradu krmných antibiotik.

Heinrichs a kol. (2003) srovnávali MOS v množství 4 g/den s kombinací neomycinu a oxytetracyklinu u telat v období mléčné výživy. Přídavek MOS i antibiotik zvýšil rychlost růstu telat a zlepšil konzistenci výkalů ve srovnání s kontrolou. Tito autoři rovněž považují MOS za vhodnou alternativu antibiotik ve výživě telat.

Autorům studie je známa jen jedna práce o použití MOS ve výživě králíků. Pinheiro a kol. (2004) přidávali MOS do krmné směsi králíků po odstavu v množství 0, 1, 1,5 a 2 g/kg. Při dávkování 1 g/kg byla v obsahu slepých střev nalezena nejvyšší koncentrace těkavých mastných kyselin. Přídavek MOS zvýšil délku klků, zvětšil tedy absorpční plochu střeva. Uvedená práce je tudíž zajímavá, řeší však jen dílčí problémy, které s použitím MOS souvisí.

### ➤ **Rostlinné extrakty**

Rostlinné extrakty se v současné době uplatňují zejména ve výživě drůbeže a prasat. Trh nabízí množství přípravků (např. CRINA<sup>®</sup> Poultry, X-tract a pod.). Přípravek CRINA<sup>®</sup> Poultry, který je směsí esenciálních olejů s obsahem thymolu, je výrobkem stejnojmenné firmy. Losa a Köhler (2001) informují o zkouškách tohoto preparátu v provozních podmínkách na velkém počtu kuřecích brojlerů (30 tis. kuřat v pokusné i kontrolní skupině). V pokusné skupině byl Zn-bacitracin (20 mg/kg krmiva) nahrazen esenciálními oleji (50

mg/kg) aniž by došlo ke snížení hmotnostních přírůstků. Za hlavní přínos použití esenciálních olejů považují autoři redukcii počtu *Clostridium perfringens* v tenkém střevu i slepých střevech kuřat. Jiní autoři (Lee a kol., 2003) srovnali komerční preparát CRINA<sup>®</sup> Poultry s thymolem a cinnamaldehydem. Thymol a cinnamaldehyd jsou sloučeniny se známou strukturou (fenolické látky), které jsou složkami esenciálních rostlinných olejů. Mají antimikrobiální účinky a jsou zdravotně bezpečné. V experimentu s 1-denními kuřecími brojlerů byla tato aditiva podána v množství 100 mg/kg krmné směsi. Ani v 21. ani ve 40. dni věku neměla vliv na rychlost růstu kuřat ani konverzi krmiva. K úhynům kuřat nedocházelo. Absenci účinku autoři vysvětlují tím, že kuřata byla zdravá, optimálně živena a umístěna v dobrých zoohygienických podmínkách. Mitsch a kol. (2004) zkoušeli rovněž směsi esenciálních olejů s obsahem thymolu, eugenolu a kurkuminu u kuřat, se zaměřením na možnost prevence proliferace klostridií v trávicím traktu. Další autoři (Giannenas a kol., 2004) zkoušeli přídavek oregana (dobromysl) v množství 2,5 - 10 g/kg krmiva kuřat infikovaných kokcidiemi *Eimeria tenella*. Doporučují oregano jako alternativu k ionoforovým kokcidiostatikům.

### ➤ **Organické kyseliny**

Dávno předtím než byly organické kyseliny použity ve výživě zvířat byly jejich antimikrobiální vlastnosti využívány k prodloužení trvanlivosti potravin. Nejznámější příklady jsou kyseliny octová a mléčná, nověji také benzoová a sorbová. Antimikrobiální účinky mají kyseliny monokarboxylové i s více karboxyly, aromatické, hydroxykyseliny, kyseliny nasycené i nenasycené. Ve srovnání s anorganickými kyselinami se jedná o kyseliny slabé u nichž stupeň disociace závisí na pH prostředí. Hodnota pH tudíž ovlivňuje jejich účinnost. V nedisociované formě mohou procházet buněčnou membránou a v cytoplasmě, jejíž pH je cca 7,2 pak disociují na anion a proton. Bakterie musí neutrální pH cytoplasmy udržovat na stálé hodnotě, aby nebyly ohroženy funkce makromolekul. Přebytek protonů musí vytlačovat protonovou pumpou za spotřeby ATP, což buňku zbavuje energie a vyčerpává. Kromě tohoto jednoduchého vysvětlení existují i další, která předpokládají interakci organických kyselin se strukturou cytoplasmatické membrány, denaturaci acidolabilních proteinů a poškození DNA. Stejně jako v obdobných situacích, bakterie se mohou účinkům organických kyselin ve větší či menší míře bránit. Bakterie mohou alkalizovat cytosol dekarboxylací aminokyselin a opravovat poškozené makromolekuly (Bearson a kol., 1997).

### ➤ **Použití organických kyselin ve výživě zvířat**

Zatím největšího uplatnění doznalo použití organických kyselin ve výživě prasat. Tsiloyiannis a kol. (2001) zkoušeli několik organických kyselin (mléčnou, propionovou, mravenčí, jablečnou, fumarovou, citronovou) v množství 1,0- 1,6% krmné směsi selat. Kromě negativní kontroly byly součástí pokusu i kontroly pozitivní, s antibiotiky linkomycinem a spektinomycinem. Přídavek organických kyselin snížil výskyt průjmů, enterotoxigenních kmenů *Escherichia coli* a zvýšil přírůstky hmotnosti selat. Pro kontrolu průjmů se nejvíce osvědčila kyselina mléčná. V této souvislosti možno rovněž uvést, že kyselina mléčná zvyšuje permeabilitu vnější buněčné membrány a činí buňku citlivější vůči účinku antimikrobiálních látek (Alakomi a kol., 2000). Za zmínku stojí i růstově-stimulační účinek mravenčanu draselného, který u selat pozorovali Windisch a kol. (2001).

U drůbeže byla z organických kyselin nejčastěji použita kyselina fumarová, Vogt a Matthes (1981) zjistili, že kyselina fumarová zvýšila u kuřecích brojlerů konverzi krmiva o 3,5 - 4,0%. Patten a Waldroup (1988) zjistili, že optimální koncentrace kyseliny fumarové z hlediska rychlosti růstu byla 0,5 - 1,0%. Při vyšších koncentracích pozorovali již snížení příjmu krmiva. Výsledky dalších pokusů s kyselinou fumarovou u drůbeže publikovali Skinner a kol. (1991) a Runho a kol. (1997). Účinek kyseliny jablečné, sorbové a vinné (0,5 - 2,0%) v krmné směsi brojlerů studovali Vogt a kol. (1982). Nejlepší výsledky získali s přídavkem 1,12% kyseliny sorbové a 0,33% kyseliny vinné. Výsledky úspěšného pokusu s 2% kyseliny mléčné u brojlerů zveřejnili Versteegh a Jongbloed (1999).

Organické kyseliny - jablečná a fumarová - přichází v úvahu jako možná náhrada monensinu ve výkrmu skotu (Castillo a kol., 2004).

### ➤ **Srovnání účinku organických kyselin na enteropathogenní bakterie**

Organické kyseliny přicházejí v úvahu k náhradě antibiotik používaných k prevenci průjmových onemocnění zvířat po odstavu. Mohly by omezit růst pathogenních bakterií v trávicím traktu a snížit riziko kontaminace živočišných produktů těmito bakteriemi (Ricke, 2003). Níže uvádíme výsledky našeho srovnání účinku mastných kyselin s 2 - 18 atomy C, kyseliny citronové, fumarové, jablečné a mléčné při pH blízkém hodnotě 6, což je hodnota typická pro sekce trávicího traktu s výjimkou žaludku. Ke srovnání jsme použili kmeny *E. coli*, salmonely a *Cl. perfringens*. Kromě uvedených kyselin jsme zkoušeli i účinek monolaurinu, tj. esteru glycerolu a kyseliny laurové. Výsledky v Tab. 5 a 6 jsou vyjádřeny

jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobiální látky, která postačuje k zabránění růstu bakterie a spotřebě glukosy obsažené v médiu.

**Tabulka 5:** Minimální inhibiční koncentrace (mg/ml) mastných kyselin vůči *E. coli*, salmonelám a *Cl. perfringens* při růstu na glukose.

	<i>E. coli</i>		<i>S. enteritidis</i>	<i>S. infantis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Cl. perfringens</i>	
	CCM 3954	CCM 4225	ATCC 13076	K2	K3	CCM 4435 <sup>T</sup>	CNCTC 5459
C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub>	r	r	r	r	r	r	r
C <sub>8</sub>	2	2	3	3	3	2	1
C <sub>10</sub>	5	5	r	r	r	1	1
C <sub>12</sub>	r	r	r	r	r	0,1	0,2
C <sub>14</sub>	r	r	r	r	r	0,1	0,2
C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	r	r	r	r	r	r	r
C <sub>18:1</sub>	r	r	r	r	r	2	3
C <sub>18:2</sub>	r	r	r	r	r	r	2

r, resistance (MIC > 5 mg/ml)

**Tabulka 6.** Minimální inhibiční koncentrace (mg/ml) monolaurinu a pěti organických kyselin vůči *E. coli*, salmonelám a *Cl. perfringens* při růstu na glukose.

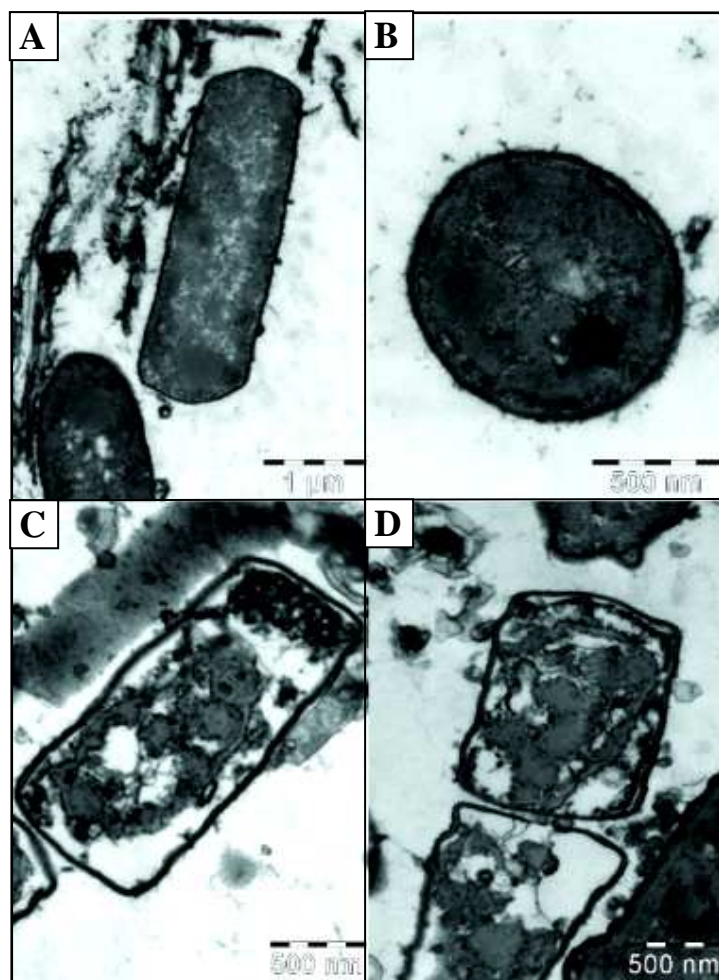
	<i>E. coli</i> (dva kmeny)	<i>Salmonella</i> spp. (3 druhy)	<i>Cl. perfringens</i> (dva kmeny)
Monolaurin	r	r	3
K. citrónová	r	r	4
K. jantarová, fumarová, jablečná, mléčná	r	r	r

r, resistance (MIC > 5 mg/ml)

Z výsledků vyplývá, že jedinou látkou, která inhibovala při daném pH růst a utilizaci glukosy u všech testovaných kmenů, byla kyselina kaprylová (C<sub>8</sub>). Její MIC kolísaly od 1 mg/ml (*Cl. perfringens* CNCTC 5459) do 3 mg/ml (*Salmonella* spp.). Byla jedinou kyselinou inhibující salmonely. (Tab. 5). Kmeny *E. coli* byly inhibovány také kyselinou kaprinovou (C<sub>10</sub>). Klostridie byly inhibovány mastnými kyselinami o střední délce řetězce (C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>), kyselinou olejovou (C<sub>18:1</sub>) a kmen CNCTC 5459 také kyselinou linolovou (C<sub>18:2</sub>). Růst *Cl. perfringens* byl inhibován také monolaurinem (MIC = 3 mg/ml) a kyselinou citrónovou (MIC = 4 mg/ml). Další organické kyseliny zůstaly bez vlivu na bakterie zařazené do sledování

(Tab. 6). Výsledky dobře dokumentují skutečnost, že (a) gramnegativní bakterie (*E. coli*, salmonely) jsou odolnější k antimikrobiálním látkám než gram pozitivní klostridie, rovněž (b) potvrzují výrazný antimikrobiální účinek mastných kyselin o střední délce řetězce, známý z literatury (přehledný referát: viz Thormar a Bergsson, 2001).

Obrázek 1A a 1B ukazuje podélný a příčný řez bakterií *Cl. perfringens* CCM 4435<sup>T</sup>. Obrázek 1C ukazuje morfologické změny buněk téže bakterie pro ošetření kyselinou laurovou (1 mg/ml; 30 min.). Obrázek 1D, totéž po působení monolaurinu (5 mg/ml; 30 min.).



**Obr. 1.**

Účinek kyseliny laurové a jejího monoglyceridu na ultrastrukturu *Cl. perfringens* CCM 4435<sup>T</sup>, pozorovaný v elektronovém mikroskopu.

A, B - kontrolní vzorky.

C - po působení kyseliny laurové (1 mg/ml).

D - po působení monolaurinu (5 mg/ml).

Řezy bakterií byly připraveny v laboratoři TEM v ÚŽFG AV ČR v Liběchově, snímky zhotoveny v MBÚ AV ČR (elektronový mikroskop Philips CM 100 s digitální kamerou Mega View II; 80 kV). Snímky ukazují rozpad cytoplasmatické struktury a oddělení vnitřní a vnější buněčné membrány účinkem obou antimikrobiálních lipidů.

➤ **Použití antimikrobiálně aktivních lipidů ve výživě zvířat**

Dierick a kol. (2002) zkoušel přidavek oleje sestávajícího z triacylglyceridů kyseliny kaprylové a kaprinové do krmné směsi selat v koncentraci 5%. Olej kombinovali s přidavkem komerční lipasy. Rychlost růstu selat byla v pokusné skupině o 12% větší. S přidavkem směsi organických kyselin (0,25% citronová, 0,75% fumarová, 0,50% mravenčan Ca) nebyly dosaženy podobně příznivé výsledky.

Přídavek kyseliny kaprylové (5 g/kg) a oleje z triacylglycerolů kyseliny kaprylové a kaprinové (10 g/kg) do krmné směsi selat byl zkoušen i u nás (Marounek a kol., 2004). V třítydenním pokusu se 40ti selaty (po odstavu ve 4 týdnech věku) ve skupině bylo dosaženo signifikantně lepších přírůstků ve skupině s kyselinou kaprylovou, zatímco přidavek komerčně dostupného oleje, ke kterému nebyla přidána lipasa, neměl účinek (Tab. 7). Pozornost zasluhuje zjištění, že v pokusných skupinách bylo o týden zpožděno vylučování oocyst kryptosporidií a patentní perioda byla kratší.

**Tabulka 7.** Účinek kyseliny kaprylové a oleje obsahujícího triacylglyceroly kyseliny kaprylové a kaprinové na růst selat

	Kontrola	C <sub>8</sub>	Olej C <sub>8</sub> + C <sub>10</sub>
Počáteční hmotnost (kg)	8,28 ± 0,18 <sup>a</sup>	8,28 ± 0,15 <sup>a</sup>	7,69 ± 0,21 <sup>a</sup>
Přírůstek ž. hm. (kg)			
1. týden	0,51 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,14 <sup>a</sup>
2. týden	1,50 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,14 <sup>a</sup>
3. týden	1,63 ± 0,31 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,78 ± 0,18 <sup>a</sup>
1. - 3. týden	3,64 ± 0,43 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,36 <sup>b</sup>	3,95 ± 0,35 <sup>ab</sup>
Konečná hmotnost (kg)	11,92 ± 0,41 <sup>a</sup>	13,25 ± 0,35 <sup>b</sup>	11,64 ± 0,42 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> p < 0,05

V našich podmínkách byl také zkoušen účinek kyseliny kaprylové (5 g/kg) na růst a mortalitu brojlerových králíků (Skřivanová a Marounek, 2002). Uskutečnily se 2 pokusy na různých farmách s odstavenými králíky věku 5 týdnů. V žádném neměla kyselina kaprylová vliv na růst králíků, na farmě s vyššími úhyny však bylo docíleno jejich signifikantního snížení (Tab. 8).

**Tabulka 8.** Účinek kyseliny kaprylové na růst a mortalitu králíků

	Kontrola	K. kaprylová (5 g/kg)
Počet králíků	42	42
Počáteční hmotnost (kg)	940 ± 115	939 ± 99
Konečná hmotnost (kg)	2299 ± 304	2331 ± 238
Mortalita	7 <sup>a</sup> (16,7%)	0 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>  $p < 0,05$

Obdobný pokus jsme uskutečnili s přidavkem 10 g/kg komerčně dostupného oleje na bázi triacylglycerolů kyseliny kaprylové a kaprinové (nepublikované výsledky). Do pokusné i kontrolní skupiny bylo zařazeno 108 králíků věku 5 týdnů. V pokusné skupině byla snížena mortalita mladých králíků téměř na polovinu, z 27,8% na 15,7% ( $P < 0,05$ ), bez vlivu na růst. V případě králíků není přidavek lipasy nutný neboť lipolytická aktivita v trávicím traktu králíků je vysoká (Moreau a kol., 1988).

#### ➤ *Měď a další prvky s vyšší atomovou hmotností*

Antimikrobiální a růstově-stimulační účinky mají i některé anorganické látky. Sloučeniny As, které byly zmíněny v historickém přehledu se dnes nepoužívají. Výhodou sloučenin Cu, Zn a Mn je to, že nezpůsobují vznik rezistence na antibiotika užívaná v humánní léčbě a ukládání v tkáních (vyjma jater) je dle našich zkušeností minimální (např. Skřivanová a kol., 2002). V EU je však jejich použití s ohledem na zatížení půdy omezeno (nařízení č. 3316/98). Antimikrobiálně působící přídavek je povolen pouze u selat ve věku do 16 týdnů, kdy se smí přidávat až 175 mg/kg krmiva. Zajímavou práci publikovali He a Rambeck (2000), kteří zkoušeli přídavek chloridů vzácných zemin (lanthanu, ceru a preseodymu) v množství 75 a 150 mg/kg krmiva selat. Pozorovali zvýšení hmotnostních přírůstků o 19% a konverze krmiva o 10%. Záporům práce byl malý počet selat ve skupině, pouze 7 a 7.

#### ➤ *Enzymy*

Enzymy můžeme těžko považovat za antimikrobiální látky, přesto mohou růst bakterií ovlivňovat. Některé polysacharidy (arabinoxylany,  $\beta$ -glukany), které jsou v žitě, ječmeni, ovsu i v pšenici značně zvyšují viskozitu střevního obsahu. Ovlivňují tím nejen proces trávení a vstřebávání živin, ale i umožňují proliferaci patogenních bakterií (McDonald a kol., 2001). Přídavek xylanasy viskozitu střevního obsahu snižuje (Bartelt a kol., 2002), stejně i přídavek



$\beta$ -glukanasy. Snížením viskozity se zrychlí tok zažitiny střevem a zkrátí se čas, který je pro množení bakteriím k dispozici. U pomalu rostoucích kmenů to znamená vyplavení z trávicího traktu, u ostatních alespoň snížení jejich počtů. Více o použití krmných enzymů - viz Brož (2004).

## **Závěrečné poznámky**

Účinnosti, kterou měla klasická krmná antibiotika jejich současně uvažované náhrady stěží dosáhnou, snad jen ve specifických případech. Zatím nelze zodpovědně rozhodnout, které alternativy k antibiotikům jsou nejlepší. Na dobrém teoretickém základě stojí použití mannanoligosaccharidů. Doporučené dávkování (2 - 4 g/kg) však může být pro získání optimálního účinku nízké a je zřejmě dáno cenou preparátu. Některé výhrady lze uplatnit k použití rostlinných extraktů. Jedná se o směsi účinných látek, z nichž některé mohou mít po vstřebání i nepříznivé účinky. Je také otázka, do jaké míry je jejich kvalita standardní a zda některé jejich složky nebudou vyvolávat zkříženou rezistenci k antibiotikům používaným lékaři. Účinek většiny organických kyselin, které mají nízké  $pK_a$ , je omezen na sekce trávicího traktu s nízkým pH (žaludek, snad i vole). Mastné kyseliny o střední délce řetězce působí v širším rozmezí pH, nevýhodou je omezená dostupnost za přijatelnou cenu a také to, že se vstřebávají na začátku trávicího traktu. Řešením je jejich podávání ve formě triacylglycerolů, podle potřeby i s přidavkem lipasy. Obecně je třeba podpořit takový výzkum alternativ k nedovoleným antibiotikům, který bude kriticky zaměřen a nezávislý na komerčních zájmech.

## **Seznam literatury**

- Abe, F., Ishibashi, N., Shimamura, S. (1995). Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 78: 2838-2846.
- Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2001-2005.
- Anonym 1 (2000): Premixy krmných aditiv s mikroprvky. Biofaktory Praha s.r.o.
- Barrow (1992). Probiotics for chickens. In: R Fuller (ed) *Probiotics – The Scientific Basis*, Chapman & Hall, London, 225-257.

- Bartelt, J., Jadamus, A., Wiese, F., Swiech, E., Buraczewska, L., Simon, O. (2002). Apparent precaecal digestibility of nutrients in digesta of the small intestine of growing pigs as affected by various digesta viscosities. *Arch. Anim. Nutr.* 56: 93-107.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 173-180.
- Brož, J. (2004). Nové směry ve využívání krmných aditiv. In: Chov drůbeže 2004. Argonomická fakulta MZLU v Brně.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Méndez, J., Pereira, V., López-Alonso, M., Miranda, M., Hernández, J. (2004). Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115: 101-116.
- Cole, D.J.A., Wiseman, J., Davies, J., Patridge, G.C., Reeve, A. (1992). The effect of dietary electrolyte balance on the performance of growing pigs. *Anim. Prod.* 54: 485.
- Conway, P.L. (1997). Development of intestinal Microbiota. In: *Gastrointestinal Microbiology* Mackie, I.R., White, B.A., Isaacson, R.E. (eds.), Chapman & Hall, London, p. 3-38.
- Crittenden, R.G. (1999). Prebiotics. In: GW Tannock (ed) *Probiotics – A Critical Review*. Horizon Scientific Press, Norfolk, England, p. 141-156.
- Crittenden, R.G., Playne, M.J. (1996). Production, properties, and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Tech.* 7: 353-361.
- Davidson, J.N., Hirsh, D.C. (1976). Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. *Infect. Immun.* 13: 1773-1774.
- Davis, M.E., Brown, D.C., Maxwell, C.V., Johnson, Z.B., Kegley, E.B., Dvorak, R.A. (2004a). Effect of phosphorylated mannans and pharmacological additions of zinc oxide on growth and immunocompetence of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82: 581-587.
- Davis, M.E., Maxwell, C.V., Erf, G.F., Brown, D.C., Wistuba, T.J. (2004b). Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82: 1882-1891.
- Dawson, K.A., Newman, K.E., Boling, J.A. (1990). Effects of microbial supplements containing yeast on lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities, *J. Anim. Sci.* 68: 3392-3398.
- Devillard, E., Bera-Maillet, C., Flint, H.J., Scott, K.P., Newbold, C.J., Wallace, R.J., Jouany, J.P., Forano, E. (2003). Characterization of XYN10B, a modular xylanase from the ruminal protozoan *Polyplastron multivesiculatum*, with a family 22 carbohydrate-binding module that binds to cellulose. *Biochem. J.* 373: 495-503.

- Dierick, N.A., Decuyper, J.A., Molly, K., Van Beek, E., Vanderbeke, E. (2002). The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance. *Livestock Production Science*, 76, 1–16.
- Duval-Ilaf, Y., Chappuis, J.P., Ducluzeau, R., Raibaud, P. (1983). Intraspecific interaction between *Escherichia coli* strains in human newborns and in gnotobiotic mice and piglets. *Prog. Food Nutr. Sci* 7: 107-116.
- Ervolder, T.M., Gudkov, A.V., Gudkov, S.A. (1984). Use of bifidobacteria in control of gastrointestinal disorders in piglets and broiler chicks. *Moloč. Prom.* 8: 18-20.
- Ewing, W.N., Cole, D.J.A. (1994). *The living gut*. Context. Carrycastle Road, Dungannon, N. Ireland.
- Fernandez, F., Hinton, M., Van Gils, B. (2002). Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathol.* 31: 49-58.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-368.
- Fuller, R. (1992). The effect of probiotics on the gut micro-ecology. In: B. J. B. Wood (Ed.): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Applied Sci., London, p. 69-114.
- Fuller, R. (1997). Probiotics for farm animals. In: GW Tannock (ed) *Probiotics – A Critical Review*. Horizon Scientific Press, Wymondham, England, 15-22.
- Fuller, R., Barrow, P.A., Brooker, B.E. (1978). Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 582-591.
- Fuller, R., Cole, C.B. (1988). The scientific basis of the probiotic concept. *Proc. Conf. AFRC Inst. Grassland Anim. Prod.*, Hurley 29. Nov. 1988. Ed. BA Stark JM Wilkinson, Chalcombe Publication, UK.
- Giannenas, I.A., Florou-Paneri, P., Papazahariadou, M., Botsoglou, N.A., Christaki, E., Spais, A.B. (2004). Effect of diet supplementation with ground oregano on performance of broiler chickens challenged with *Eimeria tenella*. *Arch. Geflügelkd.* 68: 247-252.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Gilliland, S.E. (2001). Probiotics and prebiotics. In: *Applied Dairy Microbiology*, Marth, E.H., Steele, J.L. (eds.), Marcel Dekker, New York, s. 327-343.

- Goren, E., De Jong, W.A., Doornenbal, P., Koopman, J.P., Kennis, H.M. (1984). Protection of chicks against *Salmonella infantis* induced by strict anaerobically cultured intestinal microflora. *Vet. Quart.* 6: 22-26.
- He, M.L., Rambeck, W.A. (2000). Rare earth elements - a new generation of growth promoters for pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 53: 323-334.
- Heinrichs, A.J., Jones, C.M., Heinrichs, B.S. (2003). Effect of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dietary calves. *J. Dairy Sci.* 86: 4064-4069.
- Hespell, R.B., Akin, D.E., Dehority, B.A. (1997). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In: *Gastrointestinal Microbiology* Mackie, I.R., White, B.A., Isaacson, R.E. (eds.), Chapman & Hall, London, p. 216-240.
- Hill, M.J. (1995). The normal gut bacterial flora. In: *Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology*, Hil, M.J. (ed.), Taylor and Francis, London s. 5-30.
- Hinton, A., Corrier, D.E., Ziprin, R.L., Spates, G.E., De Loach, J.R. (1991). Comparison of the efficacy of cultures of cecal anaerobes as inocula to reduce *Salmonella typhimurium* colonization in chicks with or without dietary lactose. *Poultry Sci.* 70: 67-73.
- Chambers, J.R., Spencer, J.L., Modler, H.W. (1997). The influence of complex carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization, pH, and density of broiler ceca. *Poultry Sci.* 76: 445-451.
- Chang, C.H., Day, D.F. (2004). Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. *Poultry Sci.* 83: 1302-1306.
- Chaucheyras-Durand, F., Masseglia, S., Fonty, G. (2005). Effect of the microbial feed additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 on protein and peptide degrading activities of rumen bacteria grown *in vitro*. *Current Microbiol.* 50: 96-101.
- Impey, C.S., Mead, G.C., George, S.M. (1982). Competitive exclusion of Salmonellas from chick caecum using a defined mixture of bacterial isolates from the caecal microflora of an adult bird. *J. Hyg., Camb.* 89: 479-490.
- Jonsson, E., Conway, P. (1992). Probiotics for pigs. In: R Fuller (ed) *Probiotics – The Scientific Basis*, Chapman & Hall, London, p. 59-141.
- Juven, B.J., Meinersmann, R.J., Stern, N.J. (1991). Antagonistic effect of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *J. Appl. Bact.* 70: 95-103.
- Kasper, H. (2001). *Intestinal Microflora and Human Health*. Yakult Europe B.V.

- Kimura, N., Yoshikane, M., Kabayashi, A., Mitsuoka, T. (1983). An application of dried bifidobacteria preparation to scouring animals. *Bifidobacter. Microflora* 2: 41-55.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 663-693.
- Krause, L.J., Forsberg, C.W., Connor, D.L. (1996). Feeding human milk to rats increased *Bifidobacterium* in the cecum and colon which correlates with enhanced folate status. *J. Nutr.* 126: 1505-1511.
- Lee, K.-W., Everts, H., Kappert, H.J., Frehner, M., Losa, R., Beynen, A.C. (2003). Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poultry Sci.* 44: 450-457.
- Leffler, H., Masiarz, F.R., Baronds, S.H., (1989). Soluble lactose bindings vertebrate lectins: a growing family. *Biochemistry* 28: 9222-9229.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Losa, R., Köhler, B. (2001). Prevention of colonisation of *Clostridium perfringens* in broilers intestine by essential oils. Proc. 13<sup>th</sup> Eur. Symp. Poultry Nutr., p. 133, Blankeberge (Belgium).
- Lund, A. (1974): Yeast and moulds in the bovine rumen. *J. Gen. Microbiol.* 81: 453-462.
- Marounek, M., Rada, V. (1998). Age effect on in vitro fermentation pattern and methane production in the caeca of chickens. *Physiol. Res.* 47: 259-263.
- Marounek, M., Skřivanová, E., Skřivanová, V. (2004). A note on the effect of caprylic acid and triacylglycerols of caprylic and capric acid on growth rate and shedding of coccidia oocysts in weaned piglets. *J. Anim. Feed Sci.* 13: 269-275.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12: 173-182.
- McAllister, J.S., Kurtz, H.J., Short, E.C. (1979). Changes in the intestinal flora of young pigs with postweaning diarrhea of edema disease. *J. Anim. Sci.* 49: 868-879.
- McDonald, D.E., Pethick, D.W., Mullan, B.P., Hampson, D.J. (2001). Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *Br. J. Nutr.* 86: 487-498.
- Mead, G.C. (1989). Microbes of the avian caecum; types present and substrates utilized. *J. Exp. Zool. Suppl.* 3: 48-54.

- Mead, G.C. (1997). Bacteria in the gastrointestinal tract of birds. In: *Gastrointestinal Microbiology*. Mackie, I.R., White, B.A., Isaacson, R.E. (eds.), Chapman & Hall, London, p. 216-240.
- Mečnikov, I. (1907). *The prolongation of life. Optimistic Studies*. William. Heineman, London.
- Mičan, P. (1985). Hygienické aspekty použití probiotik v živočišné výrobě. Sbor. 1. celostát. kolok. „Mikrobiotika ve výživě“. Pohořelice s. 3-5.
- Mikkelsen, L.L., Bendixen, C., Jakobsen, M., Jensen, B.B. (2003). Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 654-658.
- Miller, T.L., Wolin, M.J., Kusel, E.A. (1986). Isolation, and characterization of methanogens from animal faeces. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 234-238.
- Mitsch, P., Zitterl-Eglseer, K., Köhler, B., Gabler, C., Losa, R., Zimpernik, I. (2004). The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Sci.* 83: 669-675.
- Mitsuoka, T. (1992). The human gastrointestinal tract. In: B. J. B. Wood (Ed.): *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier Appl. Sci., London, p. 69-114.
- Moore, P.R., Evenson, A., Luckey, T.D., McCoy, E., Elvehjem, C.A., Hart, E.B. (1946). Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem.* 16: 437.
- Moreau, H., Gargouri, Y., Lecat, D., Junien, J.L., Verger, R. (1988). Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 959: 247-252.
- Morehouse, N.F., Mayfield, O.J. (1946). The effect of some aryl arsonic acids on experimental coccidiosis infection in chickens. *J. Parasitol.* 32: 20.
- Morishita, Y., Mitsuoka, T., Kaneuchi, C. (1971). Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens *Jap. J. Microbiol.* 15: 531-538.
- Ohya, Y., Ihara, K., Murata, J., Sugitou, J., Ouchi, T. (1994). Preparation and biological properties of dicarboxy-glucomannan enzymatic degradation and stimulating activity against cultured macrophages. *Carbohydr. Polym.* 25: 123-130.
- Ouweland, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-289.
- Oyrzabal, O.A., Conner, D.E. (1995). *In vitro* fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. *Poultry Sci.* 74: 1418-1425.

- Parker, R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibioticum story. *Anim. Nutr. Hlth* 29: 4-8.
- Paterson, J.A., Orban, J.I., Sutton, A.L., Richards, G.N. (1997). Selective enrichment of bifidobacteria in the intestinal tract of broilers by thermally produced kestoses and effect on broiler performance. *Poultry Sci.* 76: 497-500.
- Patten, J.D., Waldroup, P.W. (1988). Use of organic acids in broiler diets. *Poultry Sci.* 67: 1178-1182.
- Pearson, G.R., McNulty, M.S., McCracken, R.M., Curran, W. (1992). Scanning electron microscope observation of segmented filamentous bacteria in the small intestine of domestic fowl. *Vet. Rec.* 111: 365-366.
- Pinheiro, V., Alves, A., Mourão, J.L., Guedes, C.M., Pinti, L., Spring, P., Kocher, A. (2004). Effect of mannan oligosaccharides on the ileal morphometry and cecal fermentation of growing rabbits. *Proc. 8th Wld Rabbit Congress*, p. 936-941, Puebla City, 7. - 10.9.
- Power, R. (1997). The bioscience center concept : A guideline for cooperation between universities and industry. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Ed.: T.P. Lyons, K.A. Jacques. Nottingham University Press.
- Rada, V., Marounek, M. (1996). Effect of monensin on the crop microflora of broiler chickens. *Ann. Zootech.* 45: 283-288.
- Rada, V., Marounek, M., Rychlý, I., Šantrůčková, D., Voříšek, K. (1995). Effect of *Lactobacillus salivarius* administration on microflora in the crop and caeca of broiler chickens. *J. Anim. Feed Sci.* 4: 161-170.
- Rada, V., Petr, J. (2002): Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. *Vet. Med. – Czech* 47: 1-4.
- Rastall, R.A., Gibson, G.R. (2002). Prebiotic oligosaccharides: Evaluation of biological activities and potential future developments. In: Tannock GW (ed) *Probiotics and Prebiotics, Where Are We Going*. Caister Acad. Press Norfolk, England, s. 107-148.
- Ricke, S.C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sci.* 82: 632-639.
- Riedel, B.B., Barber, C.W., Hays, T.A.S. (1949). The anthelmintic activity of quarternary ammonium compounds in chickens infected with *Ascardia galli*. *Poultry Sci.* 28: 830.
- Roberfroid, M. (1997): Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 427: 211-219.
- Robinson, I.M., Allison, M.J., Bucklin, J.A. (1981). Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 950-955.

- Rosell, V. (1987). Acidification and probiotics in Spanish pig and calf rearing. In: *Biotechnology in the Feed Industry*, p. 177-180. (Ed: TP Lyons). Alltech Techn. Publ. Nicholasville, Kentucky.
- Runho, R.C., Sakomura, N.K., Kuana, S., Banzatto, D., Junqueira, O.M., Stringhini, J.H. (1997). Use of an organic acid (fumaric acid) in broiler rations. *R. Bras. Zootec.* 26: 1183-1191.
- Rycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2001). A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91: 878-887.
- Salanitro, J.P., Blake, I.G., Muirhead, P.A. (1977). Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 79-84.
- Salminen, S., Ouwehand, A.C., Isolauri, E. (1998). Clinical application of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 563-572.
- Samarasinghe, K., Wenk, C., Silva, K.F.S.T., Gunasekera, J.M.D.M. (2003). Turmeric (*Curcuma longa*) root powder and mannanoligosaccharides as alternatives to antibiotics in broiler chicken diets. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 16: 1495-1500.
- Scardovi, V. (1986): Genus *Bifidobacterium*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins MD, Baltimore, p. 1418-1434.
- Shane, S.M. (2002). The antibiotic dilemma: issues and costs. *Wld Poultry* 18: 41-43.
- Schneitz, C., Nuotio, L., Kiiskinen, T., Nurmi, E. (1991). Pilot scale testing of the competitive exclusion method in chickens. *Br. Poultry Sci.* 32: 881-884.
- Schneitz, C., Una, E., Rizzo, A. (1981). The anaerobically cultured cecal flora of adult fowl that protects chicken from salmonella infections. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. 389*: 109-116.
- Silvi, S., Rumney, C.J., Rowland, I.R. (1996). An assesment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 561-564.
- Skinner, J.T., Izat, A.L., Waldroup, P.W. (1991). Research note: fumaric acid enhances performance of broiler chickens. *Poultry Sci.* 70: 1444-1447.
- Skřivanová, V., Marounek, M. (2002). Effects of caprylic acid on performance and mortality of growing rabbits. *Acta Vet. Brno* 71: 435-439.
- Skřivanová, V., Volek, Z., Březina, P., Marounek, M. (2002). Concentration of copper in muscles, liver, hair and faeces of growing rabbits fed diet supplemented with copper sulphate. *Wld Rabbit Sci.* 10: 167-170.



- Smith, H.W., Huggins, M.B. (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. J. Gen. Microbiol. 129: 2659-2675.
- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K.A., Newman, K.E. (2000). The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. Poultry Sci. 79: 205-211.
- Swann, M.M. (1969). Report of the Secretary of State for Social Services, the Secretary of State for Scotland, the Minister of Agriculture, Fisheries and Food and the Secretary of State for Wales (Cmnd. 4190). Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. London HM Stationary Office.
- Szylit, O., Nugon Baudon, L. (1985). Lactobacillus contribution to the nutritional physiology of the host. Sci. Alim. 5: 257-262.
- Škarka, P., Šestáková, I., Ryska, M., Koruna, I., Krechl, J. (1988). Studie metabolismu cyadoxu, biologicky účinné sloučeniny z řady chinoxalin-1,4-N-dioxidů. Biol. Chem. Vet. (Praha) XXIV (XXX): 327-333.
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. Curr. Opinion Microbiol. 4: 493-499.
- Thormar, H., Bergsson, G. (2001). Antimicrobial effects of lipids. Rec. Dev. Antiviral Res. 1: 157-173.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics –A comparison of functionality and efficacy. Int. J. Food Microbiol. 96: 219-233.
- Tortuero, F. (1973). Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chick on the growth, feed conversion malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. Poultry Sci. 52: 197-203.
- Tsiloyiannis, V.K., Kyriakis, S.C., Vlemmas, J., Sarris, K. (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. Res. Vet. Sci. 70: 287-293.
- Tuohy, K.M., Rouzard, G.C.M., Bruck, W.M., Gibson, G.R. (2005): Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics – assessment of efficacy. Curr. Pharm. Des. 11: 75-90.
- Versteegh, H.A.J., Jongbloed, A.W. (1999). The effect of supplementary lactic acid in diets on the performance of broilers. ID-DLO Rep. No. 99.006. Inst. Anim. Sci. Hlth., Lelystad, The Netherlands.

- Visek, W.J. (1978). The mode of growth promotion by antibiotics. *J. Anim. Sci.* 46: 1447-1469.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I. (2004). Enumeration, isolation and identification of bifidobacteria from dairy products. *Acta Agric. Slovenica* 84: 31-36.
- Vogt, H., Matthes, S. (1981). Effect of organic acids in rations on the performance of broilers and laying hens. *Arch. Geflügelkd.* 45: 221-232.
- Vogt, H., Matthes, S., Harnisch, S. (1982). Effect of organic acids in rations on the performances of broilers. *Arch. Geflügelkd.* 46: 223-227.
- Von Wright, A. (2005). Regulating the safety of probiotics – the European approach. *Current Pharm. Des.* 11: 17-23.
- Wallace, R.J., Newbold, C.J. (1992). Probiotics for ruminants. In: R Fuller (ed) *Probiotics – The Scientific Basis*, Chapman & Hall, London, p. 317-353.
- Watkins, B.A., Kratzer, F.H. (1983). Effect of oral dosing of lactobacillus strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. *Poultry Sci.* 62: 2088-2094.
- Wegener, H.C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opinion Microbiol.* 6: 439-445.
- Weimer, P.J. (1998). Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114-3122.
- Weinberg, Z.G., Chen, Y., Gamburg, M. (2004). The passage of lactic acid bacteria from silage into rumen fluid, in vitro studies. *J. Dairy Sci.* 87: 3386-3397.
- Williams, P.E.V. (1991). The effect of fungal cultures on rumen fermentation and ruminant productivity. *J. Chem. Biotech.* 51: 562-567.
- Windisch, W.M., Gotterbarm, G.G., Roth, F.X. (2001). Effect of potassium diformate in combination with different amounts and sources of excessive dietary copper on production performance in weaning piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 54: 87-100.
- Wiseman, J. (1990). Broiler production: market trends, meat quality and nutrition in the light of changing consumers requirement. In: *Biotechnology in the Feed Industry* p. 119-134. (Ed: TP Lyons). Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky.
- Ziprin, R.L., Elissalde, M.H., Hinton, A., Beier, R.C., Spates, G.E., Corrier, D.E., Benoit, T.G., De Loach, J.R. (1991). Colonization control of lactose-fermenting *Salmonella typhimurium* in young broiler chickens by use of dietary lactose. *Am. J. Vet. Res.* 52: 833-837.