

# Vědecký výbor výživy zvířat

## Netradiční probiotikum na bázi bakterií rodu *Clostridium* a jeho využití ve výživě kuřecích brojlerů

Ing. Roman Švejstl  
Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

Praha, listopad 2016



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

SOUHRN .....	2
ABSTRACT .....	3
ÚVOD .....	4
STŘEVNÍ MIKROBIOTA A UŽITKOVOST BROJLEROVÝCH KUŘAT .....	5
PROBIOTIKA.....	6
PROBIOTIKA VE VÝŽIVĚ HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT.....	7
PROBIOTIKA PRO DRŮBEŽ.....	9
PROBIOTIKA PRO PRASATA.....	10
PROBIOTIKA PRO PŘEŽVÝKAVCE.....	10
PREBIOTIKA .....	11
CLOSTRIDIUM BUTYRICUM JAKO PROBIOTIKUM .....	11
MIYA-GOLD.....	13
METODIKA POKUSU.....	15
VÝSLEDKY POKUSU NA BROJLEROVÝCH KUŘATECH .....	16
VÝSLEDKY POKUSU NA SELATECH .....	20
ZÁVĚR.....	23
SEZNAM LITERATURY .....	23

## SOUHRN

Probiotika a jiná krmná aditiva zlepšující zdravotní stav hospodářských zvířat získávají v oblasti výživy hospodářských zvířat stále větší pozornost. Miya-Gold<sup>®</sup> je jedním z těchto aditiv. Obsahuje spory probiotického kmene bakterie *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 jako účinnou složku a slouží jako stabilizátor střevní mikrobioty. Cílem této studie bylo ověřit vliv *Clostridium butyricum* na střevní mikrobiotu a mikrobiotu volete a na užitkovost brojlerů. Hypotézou bylo, že zvířata v pokusné skupině budou mít vyšší přírůstky a stabilní střevní mikrobiotu. Po většinu pokusu dni byly zjištěny statisticky významně vyšší ( $P < 0,05$ ) průměrné hmotnosti brojlerových kuřat krmných pokusnou směsí. Zároveň byly u pokusné skupiny analýzou mikrobioty zjištěny statisticky významně nižší ( $P < 0,05$ ) počty *Escherichia coli* ve slepém střevě ve voleti. U vzorků byla rovněž provedena analýza těkavých mastných kyselin, při které byl zjištěn statisticky významně vyšší ( $P < 0,05$ ) obsah kyseliny máselné u pokusné skupiny. Podobných výsledků bylo dosaženo i v pokusu na selatech. Selata v pokusné skupině vykazovala významně nižší ( $P < 0,05$ ) počty *Escherichia coli* ve slepém střevě. Výsledky naznačují schopnost probiotického kmene *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 příznivě ovlivnit střevní mikrobiotu a užitkovost hospodářských zvířat.

## ABSTRACT

Probiotics and other health-promoting additives are becoming more important in the area of animal nutrition. Miya-Gold<sup>®</sup> is one of these additives. It contains viable spores of probiotic *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain as an active substance. Its purpose is to stabilize the gut microbiota of the animal. The aim of this study was to evaluate the influence of Miya-Gold on intestinal and crop microbiota of broiler chickens and on their performance. The hypothesis was that individuals fed with Miya-Gold will have higher growth rates and more stable intestinal microbiota. We found statistically significantly higher ( $P < 0.05$ ) average weights of individuals fed by feed mixture enriched by Miya-Gold<sup>®</sup> than in the control group at the day 7, 10, 20 and 49. By the analysis of microbiota we found at the day 42 statistically significantly lower ( $P < 0.05$ ) amounts of *Escherichia coli* in the caecum and in the crop and also lower pH in the crop in the Miya-Gold group. The analysis of short-chain fatty acids was also performed and we found statistically significantly higher ( $P < 0.05$ ) amount of butyrate in the caecum of Miya-Gold group. Similar results were found in the experiment on piglets where piglets fed by feed mixture enriched by Miya-Gold<sup>®</sup> had significantly lower counts ( $P < 0.05$ ) of *E. coli* in their caeca. The results indicate the ability of Miya-Gold to affect positively the performance and the intestinal microbiota of farm animals.

## ÚVOD

Moderní velkochovy drůbeže jsou komplexními systémy, které kladou největší důraz na efektivitu produkce. Brojlerová kuřata jsou vyšlechtěna v zájmu vysoké masné užitkovosti a veškeré způsoby chovu jsou podřízeny tomuto aspektu. V důsledku toho jsou zvířata náchylná ke kolonizaci patogenními bakteriemi. Od roku 2006 vstoupil v platnost zákaz užití antibiotik ke krmným účelům, což zvýšilo poptávku po alternativních léčebných produktech a rovněž motivovalo chovatele ke zlepšení podmínek chovu.

Nyní je chovatelům nabízena pestrá paleta krmných doplňků na bázi rostlinných extraktů, minerálních látek, enzymů a probiotik. Jako probiotika jsou označovány živé mikroorganismy, které, pokud jsou podány v adekvátním množství, přispívají ke zdraví hostitele. Pro chovy drůbeže jsou využívány probiotické mikroorganismy rodů *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* nebo *Saccharomyces*. Tato studie ale bude zaměřena na netradiční druh probiotika, bakterii rodu *Clostridium*. Bakteriální kmen v této studii pochází z Japonska a našel své uplatnění v i humánní a veterinární medicíně. V posledních letech je zaváděn na evropský trh.

Ve studii jsou shrnuty základní poznatky o probioticích pro hospodářská zvířata. Velká část studie je pak věnována bakteriím rodu *Clostridium* a jejím probiotickým vlastnostem, které jsou ve studii otestovány na brojlerových kuřatech a na selatech.

## STŘEVNÍ MIKROBIOTA A UŽITKOVOST BROJLEROVÝCH KUŘAT

Střevní mikrobiota je důležitým faktorem, který ovlivňuje zdraví každého jedince tím, že chrání jeho tělo před různými nemocemi (Guarner a Malagelada 2003), přeměňuje nestravitelné sacharidy na těkavé mastné kyseliny, syntetizuje některé vitaminy a metabolizuje některé cizorodé látky (Cummings a Macfarlane 1997). Oxidace těkavých mastných kyselin přitom poskytuje 60 – 70 % energie pro enterocyty (Roediger 1995), přičemž butyrát je v tomto ohledu majoritním zdrojem a to i v případě, že jsou k dispozici jiné zdroje energie, jako třeba glukosa, nebo glutamin (Roediger 1980). Těkavé mastné kyseliny mají rovněž vliv na složení mikrobioty lumenu a udržení homeostáze (Kubena et al. 2001). Důležitý význam má i střevní mukosa, která chrání střevo před antigeny a patogeny alimentárního původu (Carroll et al. 1984). V průběhu evoluce si mukosa ve střevě vyvinula schopnost rozpoznat patogenní bakterie a účinně proti nim zasáhnout v podobě imunitní odpovědi. Naopak, hojně přítomné komensální bakterie tyto mechanismy neaktivují (Abreu et al. 2001).

Molekulárně-genetické analýzy mikrobioty monogastrů odhalily, že ekosystém gastrointestinálního traktu živočichů čítá stovky různých druhů mikroorganismů, důležitých pro hostitelský organizmus (Zhu et al. 2002). Střevní mikrobiota, která se samovolně vyvíjí v trávicím traktu, je obvykle velmi stabilní. Narušením vnějších faktorů, např. přehnanou hygienou, antibiotickou léčbou, nebo stresováním, může být tato rovnováha narušena. V přirozených podmínkách získává jedinec svou mikrobiotu hlavně od matky. U komerčně odchovaných kuřat je však tento cyklus narušen, kuřata jsou chována v uměle vytvořených podmínkách čistých inkubátorů, kde se kuře nesetká s mikrobiotou přirozenou trávicímu traktu (Lutful Kabir 2009).

Moderní velkochovy drůbeže jsou běžným prostředkem získávání drůbežího masa ve všech zemích vyspělého světa. Velkochovy jsou charakteristické svými rozlehlými halami, ve kterých je drůbež často vystavena stresujícím podmínkám, které vedou k poškození zdraví chovaných jedinců a tím i k ekonomickým ztrátám. V průběhu let minulých se hrozící nemoci kontrolovaly užíváním léčebných přípravků, mimo jiné i antibiotik. Preventivní užívání antibiotik látek má ale za následek snižování jejich účinnosti díky schopnosti bakterií získávat na tyto látky rezistenci. Především z tohoto důvodu vstoupil v roce 2006 v účinnost zákaz užívání antibiotik k preventivním účelům (EU 2001). V důsledku toho zvýšili producenti zájem o alternativní způsoby léčby a začali klást větší důraz na prevenci onemocnění chovaných zvířat. Jednou

z těchto možností je užití probiotik. Včasné podání probiotických bakterií je u drůbeže žádoucí už jen kvůli tomu, že kontakt s matkou je u kuřat v moderních odchovech nulový (Fuller 2001).

## PROBIOTIKA

Koncept zdraví prospěšných bakterií, produkujících živiny pro buňky, ochraňujících střevní epitel kompeticí a produkcí důležitých látek, nastolil myšlenku užití probiotik. Probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou podány v adekvátním množství, přispívají ke zdraví hostitele (FAO/WHO 2001). Probiotika jsou spojována především se stabilizací střevní mikrobioty a s imunomodulačními účinky. Dále je známa jejich schopnost kompetice s patogenními bakteriemi prostřednictvím produkce bakteriocinů a/nebo těkavých mastných kyselin s krátkým řetězcem (Behnsen et al. 2013).

Na rozdíl od antibiotik, jejichž cílem je mikroorganismy usmrtit, probiotika působí spíše preventivně. Využití probiotik má dlouhou historii. Již od pradávna lidé konzumovali fermentované mléko. Velký rozvoj užívání probiotik přišel ale až v 60. letech dvacátého století. Prvními využívanými kulturami byly bakterie mléčného kvašení (Rada a Šplíchal 2010).

Probiotickým se nemůže stát zdaleka každý mikroorganismus. Podle Lee a Salminen (1995) musí být probiotika rezistentní ke kyselinám a ke žluči, musí mít schopnost kolonizovat zažívací trakt zvířete, a to minimálně přechodně. Dále je doporučeno upřednostňovat kmeny probiotických bakterií, které mají schopnost adherovat na střevní buňky a rovněž by tyto mikroorganismy měly působit antagonisticky proti patogenním bakteriím, a to produkcí antimikrobiálních látek a/nebo kompeticí o substrát, nebo místo na epitelu. Zároveň musí být konzumace probiotik bezpečná a zdravotní účinky musí být klinicky prokázány. Z hlediska technologického a z hlediska stability si musí probiotika zachovávat deklarovanou životaschopnost, uchovávat dobré organoleptické vlastnosti po fermentaci, během skladování udržovat mírnou, ale přijatelnou kyselost, během výroby a skladování si zachovat schopnost kolonizace a ve fermentovaných výrobcích si musí během skladování udržovat stabilní početnost. Identifikace kmenů musí být přesná a také je třeba znát údaje o účincích, které závisí na dávce. Jako probiotika by se měly používat ty mikroorganismy, které jsou přirozené trávicímu traktu a nejlépe pocházejí z trávicího traktu stejného živočišného druhu, kterému mají být aplikována (Rada a Šplíchal 2010). Důležitá je ale i funkčnost probiotik, která je vyjádřena výslednými vlastnostmi, které jsou dány efektivními účinky a použitelností výrobku (Mattila-Sandholm et al. 2002). Vliv na funkčnost probiotik má charakter použitých kmenů a použitého krmiva, denní

dávka a stabilita produktu. Dále funkčnost ovlivňují i faktory působící při výrobě probiotik, jako třeba použité kultivační a konzervační technologie (lyofilizace, mražení, enkapsulace). Technologické vlastnosti probiotik se pak zjišťují na základě sensorických vlastností, rezistence vůči fágům, životaschopnosti během výrobního procesu a během skladování (Rada a Šplíchal 2010).

Často se stává, že je z pochopitelných důvodů kladen příliš velký důraz na technologické vlastnosti, především na stabilitu produktu, zatímco požadované *in vivo* účinky jsou opomíjeny. Díky tomu se například do probiotik pro hospodářská zvířata přidává kmen *Enterococcus faecium* M74, který je ale lidského původu a u kterého není prokázáno, že v trávicím traktu zvířat přežívá. Dobře ale snáší lyofilizace a v probiotických preparátech přežívá ve vysokých počtech. Dalším ukázkovým příkladem je používání *Bifidobacterium animalis* BB-12 v kysaných mléčných výrobcích s probiotickou kulturou. Tento kmen je naopak izolován ze zvířat (Rada a Šplíchal 2010).

## PROBIOTIKA VE VÝŽIVĚ HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

V praxi se probiotika u hospodářských zvířat využívají pro zlepšení jejich užitkovosti nebo zdravotního stavu. Fuller a Tannock (1999) uvádějí jako možné účinky probiotik následující:

- Větší odolnost proti infekčním onemocněním
- Urychlení růstu
- Zlepšení konverze krmiv
- Lepší trávení krmiv
- Lepší vstřebávání živin
- Zvýšení produkce a kvality mléka, vajec, nebo masa

Probiotika jsou imunitním systémem hostitele rozpoznávána stejně, jako je rozpoznán patogenní organismus. Ten často mění imunitní odpověď tak, aby byla snížena pravděpodobnost jeho odhalení nebo snížena imunitní odpověď. Také probiotické mikroorganismy mění imunitní odpověď, avšak mutualistickým způsobem, vzájemnou spoluprací s imunitním systémem hostitele, který jim poskytuje bezpečnou niku (Rada a Šplíchal 2010).



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

Tabulka 1: Mikroorganismy používané jako probiotika (Rada a Šplíchal 2010).

Jak již bylo zmíněno, jako probiotika by se měly používat mikroorganismy vlastní určitému živočišnému druhu. Pro lidské kojence jsou nejvhodnější bifidobakterie, zatímco pro selata a mladou drůbež jsou nejefektivnější laktobacily (Rada a Šplíchal 2010). Probiotika jsou zvířatům aplikována ve formě lyofilizovaného prášku, v pitné vodě, ve formě pasty nebo aerosolu (Fuller 1992). Nejlepším obdobím pro podání probiotik je co nejdříve po narození. Novorozená zvířata mají prakticky sterilní trávicí trakt, a tudíž je pravděpodobnost kolonizace dodanými bakteriemi nejvyšší (Rada a Šplíchal 2010).

## PROBIOTIKA PRO DRŮBEŽ

Trávicí soustava drůbeže se oproti ostatním všežravým živočichům liší ve třech zvláštěnostech: vakovitým vychlípěním hrtanu (voletem), dvěma oddíly žaludku (žláznatým a svalnatým) a dvěma slepými střevy.

Vole je zásobní orgán sloužící k uchování potravy, která je zvlhčena přijatou vodou a slinami. Nejsou v něm přítomny žádné endogenní enzymy. Celkové počty bakterií ve voleti se blíží hodnotě 9 log KTJ/g. Dominujícím druhem jsou laktobacily, které se zde vyskytují v počtech 8 – 9 log KTJ/g zejména *L. reuteri*, *L. crispatus* a *L. salivarius* (Abbas Hilmi et al. 2007). Hlavním mikrobiálním metabolitem ve voleti je tudíž kyselina mléčná, a to v koncentraci 100 – 180 mmol/L (Marounek et al. 1995). V žaludcích počet mikroorganismů klesá, v tenkém střevě pak stále dominují laktobacily a počet bakterií kaudálním směrem roste. Kromě laktobacilů se vyskytují i enterokoky a koliformní bakterie. V dolní části tenkého střeva se objevují striktní anaerobové rody *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Gemmiger* a *Fusobacterium*. (Pearson et al. 1982). Nejvyšší počty bakterií se vyskytují ve slepých střevech, kde jejich výskyt dosahuje hodnot až 11 log KTJ/g. Nejvíce zastoupeny jsou rody *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* a *Bacteroides* (Torok et al. 2011).

Mikrobiota trávicího traktu je ovlivňována především věkem a výživou. Ustálení střevní mikrobioty drůbeže trvá zhruba 4 – 6 týdnů. Složení krmiva pak ovlivňuje hlavně proximální části trávicího traktu, na mikrobiotu céka má vliv málo. Zvýšení množství snadno zkvasitelných cukrů v krmivu vede k nárůstu laktobacilů, zatímco obohacení diety o proteiny jejich počty snižuje a vede naopak k nárůstu koliformních bakterií a klostridií (Barrow 1992).

Modulace střevního obsahu v chovech drůbeže není novinkou: předstupněm ustanovení koncepce probiotik byl mimo jiné objev, že čerstvě vylíhlá kuřata mohou být ochráněna před kolonizací *Salmonella enteritidis* dávkou tráveniny ze střeva zdravého dospělého jedince (Nurmi a Rantala 1973). Ve výživě brojlerů jsou využívány probiotické bakterie patřící k rodům *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Aspergillus*, *Candida*, a *Saccharomyces*. Tyto bakterie jsou u drůbeže schopny modulace složení střevní mikrobioty a inhibice patogenů, mají imunomodulační účinky, mají příznivý vliv na histologické parametry střeva i na určité biochemické ukazatele krve a v neposlední řadě mají příznivý vliv na užitkovost, kvalitu masa a senzorické parametry (Lutful Kabir 2009). Výsledky však nejsou konzistentní. Z dostupných poznatků se jako nejvhodnější probiotika pro drůbež jeví laktobacily,

a to hlavně drůbežního původu. Nejlépe by se měly podávat co nejmladším kuřatům (Rada a Šplíchal 2010).

Netradičním, avšak potenciálně vhodným zdrojem probiotik jsou bakterie rodu *Clostridium*. Klostridie jsou grampozitivní anaerobní tyčinkovité bakterie, které tvoří charakteristické spory. Vyskytují se v půdě, odpadních vodách, trávicím traktu lidí i zvířat, mořských sedimentech i kazících se potravinách rostlinného i živočišného původu. Nejznámějšími druhy klostridií jsou ty, které způsobují závažná onemocnění lidí i zvířat. Nejčastěji se setkáme s druhem *Clostridium butyricum*, který zahrnuje patogenní i nepatogenní kmeny (Cassir et al. 2016).

## PROBIOTIKA PRO PRASATA

Prasata jsou monogastriční zvířata, u kterých jsou všechny proximální části trávicího traktu relativně bohatě osídleny mikroorganismy, a to včetně žaludku. Dominují zde bakterie mléčného kvašení, hlavně laktobacily a enterokoky v počtech okolo 7 log KTJ/g. Laktobacily se vyskytují především na nesekretující části žaludku, kde tvoří biofilm. K podobné adhezi laktobacilů dochází i na stěně tenkého střeva (McAllister et al. 1979; Fuller et al. 1978). Relativně vysoké pH žaludku usnadňuje přežívání bakterií mléčného kvašení a jejich přechod do tenkého střeva, které osídluje v hodnotách až 9 log KTJ/g (Jonsson a Conway 1992). V tlustém a slepém střevě dosahují bakterie jako obvykle nejvyšších počtů – až 11 log KTJ/g. Zajímavostí je, že ve slepém střevě se vyskytují hlavně gramnegativní bakterie, tak v tlustém jsou početnější naopak bakterie grampozitivní (Robinson et al. 1981; Salanitro et al. 1977). Mezi nejpočetnější rody patří *Lactobacillus*, *Bacteroides* a *Clostridium*. Bifidobakterie jsou zastoupeny v poměrně nízkých počtech (Jonsson a Conway 1992; Mikkelsen et al. 2003). Podobně jako pro drůbež se i pro prasata používají jako probiotika nejčastěji bakterie mléčného kvašení, především laktobacily. Využívány jsou jak druhy pro prasata přirozené (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*), tak druhy nepůvodní (*L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*), které jsou používány ke konzervaci krmiv a potravin (Jonsson a Conway 1992).

## PROBIOTIKA PRO PŘEŽVÝKAVCE

Anatomie trávicího traktu přežvýkavců je, díky existenci předžaludků, značně odlišná od anatomie trávicího traktu ostatních zvířat. Nejdůležitějším oddílem předžaludků je bachor, který

má obvykle objem 60 – 100 litrů a který obsahuje až 11 log KTJ/g mikroorganismů. Nejvýznamnějšími jsou fibrolytické bakterie, především gramnegativní celulólytická bakterie *Fibrobacter succinogenes* a grampozitivní *Ruminococcus albus* a *Ruminococcus flavefaciens*. Tyto bakterie se podílejí na rozkladu vlákniny, která tvoří podstatnou část dietárního příjmu přežvýkavců, a tím poskytují hostiteli potřebnou energii. Mikrobiální složení bacheru je velmi různorodé, svou roli zde hrají i přítomné anaerobní houby a prvoci (Krause et al. 2003; Devillard et al. 2003). V bacheru se pravidelně vyskytují i metanogenní bakterie, které vytvářejí metan z oxidu uhličitého a vodíku (Hook et al. 2010).

Mikrobiota bacheru je špatně ovlivnitelná. Obsahuje totiž obtížně kultivovatelné bakterie, a proto se pro manipulaci většinou používají látky nemikrobiálního charakteru.

Telata, stejně jako selata, trpí v raném věku průjmovými onemocněními. Ty mohou být eliminovány podáváním bakterií mléčného kvašení, zejména rodů *Lactobacillus* a *Enterococcus*. Dále se také podávají bakterie rodu *Bacillus* (Quintero-Gonzalez et al. 2003).

## PREBIOTIKA

Prebiotika jsou definována jako selektivně fermentovatelné přísady, které umožňují specifické změny jak ve složení a/nebo v aktivitě té střevní mikrobioty, která má příznivý vliv na zdraví hostitele (Roberfroid 2007). V podstatě jakákoli nestrávená živina, která se dostane až do střeva, je potenciálně prebiotická. Většina látek, označovaných jako prebiotické, jsou nestravitelné sacharidy. Momentálně se jako prebiotické označují fruktooligosacharidy, inulin, laktulosa, galaktooligosacharidy, sójové oligosacharidy, Isomaltooligosacharidy a xylooligosacharidy. Prebiotickou aktivitu vykazují i mléčné oligosacharidy. Ty jsou ale obtížně získatelné a prozatím se komerčně nevyužívají.

Ve výživě hospodářských zvířat se využívají hlavně inulin a sójové oligosacharidy.

## CLOSTRIDIUM BUTYRICUM JAKO PROBIOTIKUM

*Clostridium butyricum* je většinou komensální kmen vyskytující se v lidské i zvířecí střevní mikrobiotě i v životním prostředí. Zatímco některé kmeny byly, zvláště u dětí označeny jako patogenní, v asijských zemích jsou nepatogenní kmeny používány jako probiotikum (Cassir et al. 2016). A to je případ i kmene CBM 588 testovaného v této studii.

*Clostridium butyricum* CBM 588 (také označován jako MIYAIRI 588, nebo FERM BP-2789) byl izolován v roce 1963 ze vzorku půdy v Naganu (Japonsko). Tento kmen má v Asii

dlouhou historii využití jako probiotikum pro člověka, což dokládá mnoho studií. Seki et al. (2003) dokázali, CBM 588 dokázal jednak snížit výskyt průjmů způsobených antibiotiky u léčených dětí, tak i zabránit poklesu počtů bifidobakterií u stejné skupiny. CBM 588 tak výrazně stabilizoval střevní mikrobiotu u testovaných jedinců. Podobných výsledků dosáhli i Imase et al. (2008) u pacientů léčených s infekcí způsobenou *Helicobacter pylori*. Shimbo et al. (2005) také využili CBM 588 u pacientů léčených s *H. pylori* a zjistili, že podání CBM 588 snížilo výskyt střevních potíží a rovněž zabránilo redukci počtů *E. coli* u léčených jedinců. V jiné studii byl CBM 588 podáván pacientům společně s antimikrobiálními léky a byl sledován výskyt toxinů *Clostridium difficile*. Zatímco kontrolní skupina, která přijímala pouze léky, měla ve stolici značný výskyt těchto toxinů, u pokusných jedinců byl výskyt ojedinělý (Kuroiwa et al. 1990a). U pacientů živených sondou CBM 588 pro změnu dokázal obnovit frekvenci, konzistenci a složení stolice téměř až na stav před začátkem léčby (Ito et al. 1997). Působení CBM 588 proti patogenům dokládá i *in vitro* studie Kuroiwy et al. (1990), kteří jej testovali ve smíšených kulturách, a vyšlo jim, že CBM 588 inhiboval některé kmeny *Vibrio cholerae*, *Aeromonas hydrophila* a *Shigella flexneri*.

Mnoho pokusů bylo provedeno rovněž na zvířatech. Okamoto et al. (2000) zjistili, že podávání CBM 588 zvýšilo počty laktobacilů a eubakterií ve střevě a celkově zmírnilo příznaky kolitidy indukované dextran sulfátem sodným u pokusných myší. Otestován byl také vliv CBM 588 na enterohemorhagickou *E. coli* O157:H7 u myší. Podání CBM 588 před nebo v průběhu infekce snížilo výskyt toxinů Stx1 a Stx2 ve výkalech a pomáhalo testovaným myším přežít infekci (Takahashi et al. 2004).

Mechanismus účinku CBM 588 je stále ne zcela objasněn. Produkce butyrátu je jedním z faktorů, který zřejmě přispívá k antibakteriální aktivitě (Takashi et al. 1989). Takahashi et al. (2004) ve své studii dokonce tvrdí, že inhibiční efekt butyrátu na *E. coli* O157:H7 byl *in vitro* pozorován i při úpravě pH na neutrální. Dalším možným mechanismem účinku mohou být antiadhezivní vlastnosti CBM 588 vůči *E. coli* O157:H7, které jsou u Caco-2 buněk údajně vyšší, než při použití modelové *E. coli* K12 (Takahashi et al. 2004). Že produkce butyrátu nemusí být jedinou významnou vlastností CBM 588 naznačují i závěry Zhanga et al. (2009), kteří u několika sledovaných parametrů včetně stupně obnovení střevní mikrobioty pozorovali lepší výsledky při administraci *C. butyricum* v porovnání s podáváním butyrátu sodného.

CBM 588 není jediným kmenem klostridií s probiotickými účinky. Jiný kmen CGMCC 0313-1 byl experimentálně testován v kombinaci s *Bifidobacterium infantis* na myších s průjmem způsobeným antibiotiky a při dlouhodobém užívání tato kombinace pomohla ke znovuoobnovení normální mikrobioty, zotavení struktury střevního povrchu a k utlumení zánětlivé reakce (Ling et al. 2015). Ten samý kmen byl použit i v pokusu Zhanga et al. (2009), ve kterém byly jeho účinky při indukované kolitidě u potkanů srovnatelné s účinky melasaminu, který je při tomto stavu běžně předepisován. Další kmen *C. Butyricum* HJCB998 byl podáván brojlerovým kuřatům ve studii Yanga et al. (2012) a bylo zjištěno, že v koncentracích  $2$  a  $3 \times 10^7$  CFU/kg krmiva je schopen snížit počty *E. coli*, salmonel a *C. perfringens* v céku a naopak zvýšit počty laktobacilů a bifidobakterií, stejně jako koncentraci IgA a IgC v séru pokusných kuřat. Na brojlerech byla provedena i další studie s pokusným *C. butyricum* v kombinaci s přidávanými lipidy do krmiva. Nebylo ale zjištěno, že by pokusný kmen zvýšil užitečnost testovaných jedinců. Nicméně, bylo u nich pozorováno delší cékum a vyšší klky v jejunu, což může mít příznivý vliv na celkové zdraví střeva (Zhang et al. 2011). Kmen HM754264 pro změnu dokázal v dávkách  $10^6$  a  $10^8$  CFU/myš a den zvýšit u testovaných zvířat počty bifidobakterií a laktobacilů v céku pokusných zvířat a zároveň zvýšit poměr těchto bakterií k počtům *Clostridium perfringens* (Kong et al. 2011).

## MIYA-GOLD

Miya-Gold<sup>®</sup> je komerční název pro preparát produkovaný společností Miyarisan Pharmaceutical Co. Ltd, vedený jako zootechnické aditivum, funkční skupina: stabilizátor střevní mikrobioty. Aktivní složkou Miya-Goldu jsou životaschopné spory *Clostridium butyricum* CBM 588. Miya-Gold je v mnoha asijských zemích povolen jako aditivum jak pro lidskou výživu, tak pro výživu zvířat. V Evropské unii je produkt schválen pro výkrm brojlerových kuřat a menšinových druhů ptactva s výjimkou nosnic, odchov krůt a pro odstavená selata (EFSA 2011, 2013). Varianta probiotika pro lidskou výživu nese název Miya-Pro a byla pro užití v zemích EU povolena v roce 2014 (European Commission 2014), ve spojených státech nyní probíhá proces schvalování (U.S. National Institutes of Health 2016).

Kmen CBM 588 neprodukuje žádné toxiny, ani nedisponuje virulentními faktory.

Maximální bezpečná dávka byla stanovena na  $5 \times 10^8$  CFU/kg krmiva. Odstavená selata ale snášela bez problémů i 200krát vyšší dávky. Doporučená dávkování je uvedeno v Tabulce 2.

Druh zvířete	Maximální věk	Minimální obsah	Maximální obsah
		CFU/kg kompletního krmiva	CFU/kg kompletního krmiva
<b>Kuřata pro výkrm</b>	Do porážky	$2,5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$
<b>Menšinové druhy ptactva pro výkrm</b>	Do porážky	$2,5 \times 10^8$	-
<b>Nosnice</b>	24 týdnů	$2,5 \times 10^8$	-
<b>Menšinové druhy ptactva pro snášení</b>	20 až 30 týdnů	$2,5 \times 10^8$	-
<b>Odchov kuřat a menšinových druhů ptactva</b>	22 týdnů, nebo počátek snášení	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$
<b>Selata po odstavu</b>	120 dnů	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$

Tabulka 2: Doporučená dávkování pro jednotlivé druhy zvířat (EFSA 2013, 2011).

Miya-Gold se dodává ve dvou verzích (EFSA 2013):

- Miya-Gold<sup>®</sup> S: mrtvé pivovarské kvasnice (20 %), glukosa, kukuřičný škrob, křemičitan hlinitý (nebo zeolit) jako protispékavá látka. Koncentrace spor *Cl. butyricum* CBM 588 je  $5 \times 10^8$  CFU/g.
- Miya-Gold<sup>®</sup> EU: laktosa (25-75 %), nebo uhličitan vápenatý (17,5-52,5 %) a zeolit (7,5 – 22,5 %). Koncentrace spor *Cl. butyricum* CBM 588 je  $1 \times 10^{10}$  CFU/g.

Pět na sobě nezávislých studií bylo provedeno pro potřeby EFSA (2011) pro ověření účinnosti na brojlerových kuřatech (čtyři na Ross 308 a jedna na Cobb). Všechny experimenty trvaly 42 dnů, zvířata byla po celou dobu pokusu krmena *ad libitum* krmivem s různými přídávky Miya-Goldu a zvážena na začátku, uprostřed a na konci studie. Byly stanoveny přírůstky, konverze krmiva a úmrtnost. Následná meta-analýza prokázala, že Miya-Gold dovede v dávce  $2,5 \times 10^8$  CFU/kg významně zvýšit denní přírůstky a zlepšit konverzi krmiva.

Čtyři na sobě nezávislé studie na selatech byly pro potřeby EFSA (2013) provedeny za účelem ověření prospěšnosti Miya-Goldu pro selata, ve kterých bylo testováno 96 – 480 zvířat různých plemen, která obdržela 8 – 24 krát dávku Miya-Goldu v krmivu. Ve dvou těchto pokusech významně zvýšilo podávání Miya-Goldu denní přírůstky, případně konverzi krmiva. U zbylých dvou studií bylo zlepšení statisticky nevýznamné, nebo se skupiny nelišily. Provedená

Meta-analýza zmíněných čtyř studií zjistila, že denní přírůstky jsou statisticky významně vyšší a konverze krmiva významně lepší. Dosavadní údaje z pokusů na selatech tak korespondují s údaji z pokusů na kuřatech a společně naznačují probiotický efekt.

## METODIKA POKUSU

Bylo testováno celkem 160 brojlerových kuřat ROSS 308. Kuřata byla rozdělena do dvou skupin – kontrolní a pokusné. Kontrolní skupina dostávala po celou dobu pokusu, tj. od 2. do 49. dne *ad libitum* krmivo na bázi BR-2. Pokusná skupina dostávala po celou dobu pokusu *ad libitum* krmivo na bázi BR-2 s přidavkem 1 g/kg Miya-Gold<sup>®</sup> S. Krmivo bylo pro obě skupiny peletováno za účelem snížení prašnosti. Obě skupiny zahrnovaly 80 jedinců.

Pokus byl rozdělen na dvě části – výživářskou a mikrobiologickou. Ve výživářské části byly sledovány následující parametry:

- Průměrná hmotnost
- Konverze krmiva
- Průměrné denní přírůstky

Část mikrobiologická byla zaměřena na skupiny mikroorganismů, uvedené v Tabulce 3, kde jsou uvedeny i kultivační metody. Všechny mikroorganismy byly stanoveny plotnovou metodou za použití pěstebních médií od Oxoid Ltd., Wade Road, Basingstoke, Hampshire, Spojené království.

Testované bakterie	Kultivační médium a podmínky kultivace
<b>Celkové počty anaerobních bakterií</b>	Wilkins-Chalgren anaerobe agar s přidavkem Sójového peptonu (W+S); 37 °C, 48 h, anaerobně
<b>Bifidobakterie</b>	W+S s přidavkem mupirocinu (100 mg/L w/v) a ledové kyseliny octové (1 mL/L v/v) podle Rady a Petra (2000); 37 °C, 48 h, anaerobně
<b>Laktobacily</b>	Rogosa agar s přidavkem ledové kyseliny octové (1,32 mL/L v/v); 37 °C, 48 h, mikroaerofilně



<b>Enterokoky</b>	Slanetz-Bartley agar; 37 °C, 48 h, aerobně
<i>Escherichia coli</i>	T. B. X. agar; 37 °C, 24 h, aerobně

Tabulka 3: Pěstební média použitá pro kultivaci.

Odběr vzorků probíhal následujícím způsobem: kuře bylo humánně poraženo a ze slepého střeva a volete byl asepticky odebrán 1 g tráveniny, který byl ihned vložen do zkumavky se sterilním médiem bez zdroje uhlíku a atmosférou z CO<sub>2</sub>. Tento postup zajistil přežití anaerobních bakterií po dobu pokusu. Ihned po zisku vzorků byly tyto podrobeny analýze mikrobioty. Po naředění vzorků a jejich nanesení na pěstební média na Petriho misky byly tyto misky hermeticky uzavřeny do hrnce, ve kterém byla vyvinuta anaerobní atmosféra systémem AnaeroGen (Oxoid Ltd., Wade Road, Basingstoke, Hampshire, Spojené království).

Dále byla ve vzorcích ze slepých střev provedena analýza těkavých mastných kyselin (TMK) pomocí plynové chromatografie s použitím Stabilwax<sup>®</sup>-DA kolony a H<sub>2</sub> jako mobilní fáze. Detektor byl FID. Postup analýzy TMK byl následující. Vzorky ve zkumavkách byly zvortexovány a k 0,8 mL vzorku bylo přidáno 0,1 mL 3M HCOOH a 0,03 mL interního standardu (2-ethylbutyrová kyselina). Po centrifugaci byl supernatant (1 µL) nanesen na kolonu.

Dále byl proveden pokus na selatech. Bylo testováno 59 selat, z nichž 10 bylo vzorkováno po odstavu při zahájení pokusu, ostatní byla rozdělena do tří skupin – kontrolní, butyrátová (70% kyselina máselná, 1,5 g/kg krmiva), ve které byl jedincům podáván butyrát a pokusná, ve které byl jedincům podáván Miya-Gold<sup>®</sup> S (0,5 g/kg krmiva). Po 17 dnech výkrmu proběhla vzorkování z céka a jejuna. U vzorků byla provedena analýza mikrobioty a obsahu těkavých mastných kyselin s použitím stejné metodiky, jako u brojlerových kuřat.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno za pomoci SW Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA) s použitím dvouvýběrových t-testů s rovností rozptylů a jednofaktorové analýzy rozptylu s použitím Duncanova testu.

## VÝSLEDKY POKUSU NA BROJLEROVÝCH KUŘATECH

Naměřené hodnoty průměrné hmotnosti, denních přírůstků a konverze krmiva jsou uvedeny v Tabulkách 4, 5 a 6.

Průměrná hmotnost (g)						
Den	Den 1	Den 7*	Den 10*	Den 20*	Den 35	Den 49*
<b>Skupina</b>						
<b>Kontrola</b>	44,10 ±3,71	<b>130,96</b> ±13,19*	<b>194,46</b> ±20,64*	<b>760,08</b> ±79,59*	1767,92 ±242,09	<b>2780,91</b> ±445,41*
<b>Miya-Gold</b>	44,71 ±4,01	<b>138,09</b> ±15,85*	<b>217,25</b> ±21,83*	<b>810,26</b> ±73,56*	1787,2 ±215,09	<b>3231,67</b> ±509,15*

Tabulka 4: Průměrné hmotnosti testovaných brojlerů. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a pokusnou skupinou ( $P < 0.05$ ) jsou vyjádřeny hvězdičkou (\*).

Denní přírůstek (g)					
Den	1 - 7	1 - 10	11 - 20	21 - 35	36 - 49
<b>Skupina</b>					
<b>Kontrola</b>	14,48	16,77	56,56	67,19	72,36
<b>Miya-Gold</b>	15,56	19,17	59,30	65,13	103,17

Tabulka 5: Průměrné denní přírůstky testovaných brojlerů.

Konverze krmiva (kg)							
Den	1 - 7	1 - 10	11 - 20	21 - 35	36 - 49	Do 35	Do 49
<b>Skupina</b>							
<b>Kontrola</b>	2,09	1,90	1,81	1,82	2,76	1,90	2,08
<b>Miya-Gold</b>	1,53	1,71	1,70	2,22	2,04	1,79	1,84

Tabulka 6: Konverze krmiva testovaných brojlerů.

Z tabulek je patrné, že pokusná skupina vykazovala po většinu pokusu vyšší přírůstky a lepší konverzi krmiva. Výsledky tak naznačují schopnost Miya-Goldu zlepšit konverzi krmiva a zvýšit přírůstky, a tím i porážkovou hmotnost testovaných brojlerů. Výjimku tvoří 35. den, kdy došlo k vyrovnání skupin z hlediska průměrných schopností. Teoreticky mohlo být příčinou hierarchické chování zvířat ve skupině, kdy silnější jedinci začali zabraňovat přístupu ke krmení ostatním, v důsledku čehož se mohla podstatně zvýšit nevyrovnanost souboru (Estevez et al. 2003). Předpoklad, že Miya-Gold zvýší užitkovost brojlerů, se tedy naplnil pouze částečně. Studie provedené pro EFSA (2011) byly nastaveny na 42 dnů. Je tedy pravděpodobné, že pokud by vážení probíhalo i v naší studii ve 42. dni, došli bychom k podobným výsledkům, vzhledem k tomu že ve 49. dni se skupiny opět významně lišily. Zhang et al. (2011) testovali vliv jiného probiotického kmene *C. butyricum* a vliv na užitkovost nezjistili. Z tohoto úhlu pohledu tak lze námi testovaný kmen CBM 588 označit za účinnější. Schopnost CBM 588 zvýšit přírůstky může být způsobena produkcí kyseliny máselné, která poskytuje 60 – 70 % zdroje energie pro enterocyty (Roediger 1995).

Výsledky analýzy mikrobioty jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8. Hodnoty jsou v log KTJ/g. Výsledky analýzy TMK jsou uvedeny v tabulce 9, hodnoty jsou v mMol/L.

Cékum	Den 1		Den 10		Den 42	
	Kontrola	Miya-Gold	Kontrola	Miya-Gold	Kontrola	Miya-Gold
<b>Skupina</b>						
<b>Celkové počty</b>	10,08±0,26	10,06±0,28	10,09±0,20	10,25±0,32	10,09±0,26	10,13±0,23
<b>Bifidobakterie</b>	4,92±1,27	5,09±1,09	9,18±0,23	8,83±1,35	9,92±0,36	9,55±0,19
<b>Laktobacily</b>	5,91±0,47	6,87±0,91	9,04±0,19	8,55±0,56	8,53±0,31	9,01±0,40
<b>Enterokoky</b>	9,55±0,43	8,90±1,75	8,64±0,35	7,82±0,61	<b>8,10±0,17*</b>	<b>7,55±0,39*</b>
<i>E. coli</i>	9,60±0,06	9,03±1,70	<b>8,47±0,81*</b>	<b>7,29±0,61*</b>	<b>8,22±0,64*</b>	<b>7,00±0,92*</b>
<b>pH</b>	NT	NT	<b>5,16±0,15*</b>	<b>5,70±0,43*</b>	6,44±0,09	6,04±0,51

Tabulka 7: Analýza mikrobioty céka. Statisticky významné rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou znázorněny hvězdičkou (\*). NT = netestováno, ND = pod hranicí detekce.

Vole	Den 1		Den 10		Den 42	
	Kontrola	Miya-Gold	Kontrola	Miya-Gold	Kontrola	Miya-Gold
<b>Skupina</b>						
<b>Celkové počty</b>	8,95±0,31	9,01±0,12	9,32±0,39	9,58±0,46	8,74±0,56	9,65±0,33
<b>Bifidobakterie</b>	ND	5,40±0,46	<b>5,04±0,39*</b>	<b>4,29±0,55*</b>	5,20±0,32	4,73±0,96
<b>Laktobacily</b>	5,54±1,72	7,29±0,78	8,82±0,11	8,69±0,63	8,29±0,59	9,04±0,44
<b>Enterokoky</b>	7,73±0,78	7,84±0,28	8,08±0,33	8,34±0,63	7,18±0,43	6,94±0,40
<i>E. coli</i>	7,90±0,78	7,96±0,75	ND	ND	<b>6,73±0,52*</b>	<b>5,64±0,47*</b>
<b>pH</b>	NT	NT	4,72±0,11	4,42±0,22	<b>5,74±0,53*</b>	<b>4,72±0,35*</b>

Tabulka 8: Analýza mikrobioty volete. Statisticky významné rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou znázorněny hvězdičkou (\*). NT = netestováno, ND = pod hranicí detekce.

Den 42	Cékum		Vole	
	Kontrola	Miya-Gold	Kontrola	Miya-Gold
<b>TMK</b>				
<b>Acetát</b>	441,52±32,86	381,08±63,11	59,42±35,15	58,79±29,03
<b>Propionát</b>	183,42±41,20	196,96±57,42	1,14±2,20	0,27±0,38
<b>Isobutykrát</b>	3,37±0,68	2,14±1,23	2,19±2,85	1,85±1,52
<b>Buykrát</b>	<b>103,41±14,78*</b>	<b>132,12±18,51*</b>	ND	ND
<b>Isovalerát</b>	7,51±2,43	4,08±3,46	0,48±0,62	ND
<b>Valerát</b>	8,24±2,33	4,80±3,46	2,46±3,71	1,25±1,32
<b>Isokapronát</b>	<b>0,91±0,56*</b>	<b>2,74±1,63*</b>	4,64±7,37	3,70±4,45
<b>Kapronát</b>	1,18±2,63	028±0,40	0,84±0,91	2,78±3,54
<b>Heptanoát</b>	ND	ND	ND	ND
$\Sigma$	749,57±59,11	724,19±96,92	71,16±28,36	68,63±25,95

Tabulka 9: Analýza těkavých mastných kyselin v céku a voleti v den 42. Statisticky významné rozdíly ( $P < 0.05$ ) jsou znázorněny hvězdičkou (\*). ND = pod hranicí detekce.

V naší studii jsme zjistili statisticky významně nižší počty *E. coli* v céku pokusných kuřat, a to v obou měřeních (10. a 42. den). Yang et al. (2012) pozorovali stejný efekt u jiného probiotického kmene *C. butyricum* u brojlerů. Podle jiné studie, která se zaměřila přímo na námi testovaný kmen CBM 588 ale *E. coli* sníženy nebyly. Tato studie ale byla provedena na lidech (Shimbo et al. 2005). O tom, že CBM 588 je schopný potlačovat patogenní *E. coli* ostatně pojednává i jiný autor (Takahashi et al. 2004), dá se tedy usoudit, že poznatek o schopnosti CBM 588 snižovat počty *E. coli* je v souladu s jinými autory a v této studii byla tato schopnost jen potvrzena.

Při poslední analýze byl rovněž odhalen významný pokles enterokoků v pokusné skupině. Vzhledem k tomu, že jde o běžně se vyskytující komenzální i oportunně patogenní bakterie v trávicím traktu drůbeže (Devriese et al. 1991; Hayes et al. 2004), nepřikládáme změně jejich počtů, i s přihlédnutím ke skutečnosti, že se vyskytla pouze při posledním měření, valnější význam.

Ve voleti se významný rozdíl se vyskytl v 10. dni, ve kterém byly naměřeny nižší počty bifidobakterií v pokusné skupině, což je v rozporu s nálezy Seki et al. (2003), kteří naopak pozorovali zvýšení počtů bifidobakterií při použití Miya-Goldu. Jejich pokus ale byl proveden u léčených dětí. Zvýšení počtů bifidobakterií u kuřat pozorovali Yang et al. (Yang 2012). V této

studii ale šlo i jiný kmen. Počty bifidobakterií ve voleti se ve 42. dni lehce vyrovnaly, a ač jich stále bylo více v kontrolní skupině, byl to rozdíl statisticky nevýznamný. Vzhledem k této skutečnosti a také s přihlédnutím k tomu, že nemáme k dispozici data o vlivu Miya-Goldu na mikrobiotu volete, lze jen těžko objasnit mechanismus hypotetického vlivu Miya-Goldu na bifidobakterie ve voleti. Jiná je situace ohledně počtů *E. coli* ve voleti, které byly významně nižší u pokusné skupiny ke 42. dni, což je v souladu s výsledky, naměřenými v céku. Dále bylo ve 42. dni naměřeno nižší pH volete pokusných kuřat, což může mít protektivní vliv na horní části trávicího traktu kuřat, vzhledem k tomu, že nižší pH působí proti hnilobným bakteriím.

Analýza obsahu TMK odhalila, že jedinci z pokusné skupiny měli významně vyšší obsah butyrátu v céku, což silně naznačuje metabolickou aktivitu dodaných klostridií. Produkce kyseliny máselné může mít významný vliv při inhibici patogenních mikroorganismů, mezi které patří při určitých podmínkách i některé kmeny *E. coli* (Van Immerseel et al. 2004), což posiluje teorii o možné kompetici CBM 588 a střevních *E. coli*. Kyselina máselná je také zdrojem energie pro buňky střevního epitelu, její význam tak lze ve střevě hodnotit jako velmi pozitivní.

#### VÝSLEDKY POKUSU NA SELATECH

Dále byl proveden pokus na selatech. V tabulkách 10 a 11 jsou výsledky analýzy mikrobioty céka a jejunu ze dnů 0 a 17. Výsledky jsou uvedeny v log KTJ/g. V tabulce 12 jsou uvedeny výsledky analýzy těkavých mastných kyselin, jednotky jsou uvedeny v mMol/L.

Den 0	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Enterokoky	<i>E. coli</i>
<b>Cékum</b>	9,12±0,21	5,50±1,17	8,11±0,42	ND	4,93±0,88
<b>Jejunum</b>	8,34±0,24	4,19±0,99	7,73±0,26	ND	ND

Tabulka 10: Analýza střevní mikrobioty selat v počátku pokusu. ND = pod hranicí detekce.

Den 17	Cékum				
Skupina	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Enterokoky	<i>E. coli</i>
<b>Kontrola</b>	8,86±0,32	4,18±1,01	7,96±0,24	5,44±0,59	<b>5,85±0,83 b</b>
<b>Butyrát</b>	8,79±0,29	4,72±0,82	7,89±0,27	6,06±0,42	<b>5,67±1,28 b</b>
<b>Miya-Gold</b>	8,76±0,53	5,36±1,63	8,14±0,77	5,56±0,70	<b>4,18±0,36 a</b>
Den 17	Jejunum				
<b>Kontrola</b>	7,88±0,60	3,76±0,59	6,83±0,60	ND	ND
<b>Butyrát</b>	7,81±1,12	3,36±0,69	6,37±0,91	ND	ND
<b>Miya-Gold</b>	8,07±0,72	3,94±1,14	7,18±0,80	ND	ND

Tabulka 11: Analýza mikrobioty selat na konci pokusu. Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) jsou znázorněny odlišným znakem (a, b). ND = pod hranicí detekce.

Z výsledků pokusu na selatech jasně vyplývá, že CBM 588 byl stejně jako u pokusu na kuřatech a u výše uvedené studie (Takahashi et al. 2004) schopen významně snížit počty *E. coli*. Můžeme usuzovat, že vzhledem k tomu, že ve skupině, ve které byl podáván butyrát počty *E. coli* nebyly významně nižší v porovnání s kontrolní skupinou, tak antibakteriální aktivita pokusného kmene *C. butyricum* nemá pouze charakter inhibice kyselinou máselnou, ale že může tento jev způsobovat i jiný mechanismus. Na druhou stranu perorálně podávaný butyrát mohl být vstřebán již při průchodu trávicím traktem vzhledem k tomu, že jde o významný zdroj energie pro enterocyty a rovněž proto, že je vstřebáván v proximální části tlustého střeva (Velazquez et al. 1997). Je tedy pravděpodobné, že se podaný butyrát nedostal až do slepého střeva, případně se tam dostal v menším, než podávaném množství. Vzhledem k tomu, že v proximálnějším jejunu nebyly *E. coli* detekovány, není zcela jasné, jaký by měl samotný butyrát vliv na jejich výskyt ve střevě. Za zmínku stojí rovněž statisticky nevýznamně vyšší počty bifidobakterií v Miya-Gold skupině, což je odlišný výsledek od pokusu na kuřatech, kde naopak Miya-Gold počty bifidobakterií snižoval. Naopak, výsledek se shoduje s poznatky Konga et al. (2011), kteří ale dělali pokus na myších a s jiným probiotickým kmenem klostridií.

Den 17	Cékum									
Kyselina →	Octová	Propionová	Isomáslená	Máselná	Isovalerová	Valerová	Isohexanová	Hexanová	Heptanová	Σ
Kontrola	135,71±9,04	69,77±14,67	1,04±0,40	41,25±7,93	1,24±0,49	7,25±3,80	<b>0,31±0,07 b</b>	<b>0,56±0,53 b</b>	<b>0,77±0,17 b</b>	257,90±27,27
Butyrát	173,27±61,32	80,47±30,65	0,68±0,23	41,18±14,80	0,79±0,23	5,07±2,79	<b>0,00±0,00 a</b>	<b>0,04±0,07 a</b>	<b>0,02±0,05 a</b>	301,51±102,70
Miya-Gold	173,38±58,45	86,15±35,22	0,80±0,51	49,40±24,17	1,02±0,69	10,86±13,95	<b>0,00±0,00 a</b>	<b>0,22±0,48 ab</b>	<b>0,04±0,10 a</b>	321,87±122,98
↑Skupina↓	Jejunum									
Kontrola	28,61±10,22	0,04±0,08	<b>0,60±0,14 b</b>	0,00±0,00	<b>0,34±0,07 b</b>	0,01±0,02	<b>0,41±0,10 b</b>	<b>0,34±0,05 b</b>	<b>3,80±1,83 b</b>	34,14±11,95
Butyrát	42,31±19,82	1,28±1,93	<b>0,02±0,04 a</b>	0,20±0,53	<b>0,00±0,00 a</b>	0,00±0,00	<b>0,00±0,00 a</b>	<b>0,00±0,00 a</b>	<b>2,56±2,62 ab</b>	46,37±22,23
Miya-Gold	35,41±31,18	0,52±0,41	<b>0,11±0,21 a</b>	5,35±10,95	<b>0,22±0,45 ab</b>	0,00±0,00	<b>0,00±0,00 a</b>	<b>0,00±0,00 a</b>	<b>1,02±1,20 a</b>	42,62±41,53

Tabulka 12: Analýza těkavých mastných kyselin v céku a jejunu selat 17 dní po začátku pokusu. Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) jsou znázorněny odlišným znakem (a, b).

Statistické šetření našlo několik rozdílů mezi obsahy jednotlivých mastných kyselin jak v céku, tak v jejunu. Jde však o minoritně zastoupené kyseliny, tudíž je jejich význam ve střevě sporný. Hlavní skupiny mastných kyselin zůstaly bez významného rozdílu, ačkoli určitý trend ve vzrůstu množství těkavých mastných kyselin lze sledovat u pokusných skupin v porovnání se skupinou kontrolní. Tento jev může být výsledkem vyšší aktivity sacharolytických mikroorganismů v porovnání s proteolytickými, kam patří i hnilobné a patogenní bakterie.

## ZÁVĚR

Testovaný kmen *Clostridium butyricum* CBM 588 je podle této i dalších provedených studií schopen ovlivnit mikrobiotu céka brojlerových kuřat i selat. Zvířata, která přijímala krmivo obohacené o testovaný kmen, měla střevní mikrobiotu pozměněnou ve prospěch sacharolytických organismů, což se dá považovat, vzhledem k tomu, že patogenní bakterie patří mezi proteolytické a preferují vyšší pH, za pozitivní jev. Zároveň je CBM 588 schopen zvýšit užitek brojlerových kuřat. Dá se tedy označit za potenciálně probiotický mikroorganismus.

## SEZNAM LITERATURY

ABBAS HILMI, Hanan T, Anu SURAKKA, Juha APAJALAHTI a Per E J SARIS, 2007. Identification of the Most Abundant Lactobacillus Species in the Crop of 1- and 5-Week-Old Broiler Chickens . *Applied and Environmental Microbiology* [online]. B.m.: American Society for Microbiology (ASM), 12. 12., roč. 73, č. 24, s. 7867–7873. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01128-07

ABREU, M T, P VORA, E FAURE, L S THOMAS, E T ARNOLD a M ARDITI, 2001. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 8., roč. 167, č. 3, s. 1609–1616. ISSN 0022-1767 (Print).

BARROW, Paul A, 1992. Probiotics for chickens. In: *Probiotics: The scientific basis* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 225–257. ISBN 978-94-011-2364-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-2364-8\_10

BEHNSEN, Judith, Elisa DERIU, Martina SASSONE-CORSI a Manuela RAFFATELLU, 2013. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 3., roč. 3, č. 3, s. a010074. ISSN 2157-1422 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a010074

CARROLL, S M, G MAYRHOFER, H J DAWKINS a D I GROVE, 1984. Kinetics of intestinal lamina propria mast cells, globule leucocytes, intraepithelial lymphocytes, goblet cells and



eosinophils in murine strongyloidiasis. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. roč. 74, č. 4, s. 311–317. ISSN 0020-5915 (Print).

CASSIR, N, S BENAMAR a B LA SCOLA, 2016. Clostridium butyricum: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 1., roč. 22, č. 1, s. 37–45. ISSN 1198-743X. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.014>

CUMMINGS, J.H. a G.T. MACFARLANE, 1997. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition* [online]. B.m.: Churchill Livingstone, roč. 16, č. 1, s. 3–11. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:[10.1016/S0261-5614\(97\)80252-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-5614(97)80252-X)

DEVILLARD, Estelle, Christel BERA-MAILLET, Harry J FLINT, Karen P SCOTT, C James NEWBOLD, R John WALLACE, Jean-Pierre JOUANY a Evelyne FORANO, 2003. Characterization of XYN10B, a modular xylanase from the ruminal protozoan *Polyplastron multivesiculatum*, with a family 22 carbohydrate-binding module that binds to cellulose. [online]. červenec 2003. ISSN 0264-6021 (Print). Dostupné z: doi:[10.1042/BJ20021784](http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021784)

DEVRIESE, L A, J HOMMEZ, R WIJFELS a F HAESEBROUCK, 1991. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *The Journal of Applied Bacteriology*. 7., roč. 71, č. 1, s. 46–50. ISSN 0021-8847 (Print).

EFSA, 2011. Scientific Opinion on Miya-Gold® ( Clostridium butyricum ) as a feed additive for weaned piglets, minor weaned porcine species and minor avian species. *EFSA Journal* [online]. 6. 1., roč. 9, č. 1, s. 1951 [vid. 2016-11-11]. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.1951>

EFSA, 2013. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Miya-Gold ( Clostridium butyricum ) for chickens for fattening, chickens reared for laying and minor avian species. *EFSA Journal* [online]. 8. 1., roč. 11, č. 1, s. 3040 [vid. 2016-11-11]. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2013.3040>

ESTEVEZ, Inma, Linda J. KEELING a Ruth C. NEWBERRY, 2003. Decreasing aggression with increasing group size in young domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science* [online]. roč. 84, č. 3, s. 213–218. ISSN 01681591. Dostupné z: doi:[10.1016/j.applanim.2003.08.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2003.08.006)

EU, 2001. *Commission Regulation (EC) No 2205/2001 concerning additives in feedingstuffs as regards withdrawal of the authorisation of certain additives.*

EUROPEAN COMMISSION, 2014. *Commission Implementing Decision of 11 December 2014 authorising the placing on the market of Clostridium butyricum (CBM 588) as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council.*

FAO/WHO, 2001. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with* [online]. BOOK. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=qJqoygAACAAJ>

FULLER, R, P A BARROW a B E BROOKER, 1978. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 3., roč. 35, č. 3, s. 582–591. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242883/>

FULLER, Roy, 1992. The Effect of Probiotics on the Gut Micro-ecology of Farm Animals. In: Brian J B WOOD, ed. *The Lactic Acid Bacteria Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 171–192. ISBN 978-1-4615-3522-5. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4615-3522-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_7)

FULLER, Roy, 2001. The Chicken Gut Microflora and Probiotic Supplements. *The Journal of Poultry Science* [online]. roč. 38, č. 3, s. 189–196. Dostupné z: [doi:10.2141/jpsa.38.189](https://doi.org/10.2141/jpsa.38.189)

FULLER, Roy a G W TANNOCK, 1999. Probiotics for farm animals. *Probiotics: a critical review*. B.m.: Horizon Scientific Press, s. 15–22. ISSN 1898486158.

GUARNER, Francisco a Juan-R MALAGELADA, 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet* [online]. roč. 361, č. 9356, s. 512–519. ISSN 01406736. Dostupné z: [doi:10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)

HAYES, Joshua R, Linda L ENGLISH, Lewis E CARR, David D WAGNER a Sam W JOSEPH, 2004. Multiple-antibiotic resistance of Enterococcus spp. isolated from commercial poultry

production environments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 10., roč. 70, č. 10, s. 6005–6011. ISSN 0099-2240 (Print). Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.10.6005-6011.2004

HOOKE, Sarah E, Andre-Denis G WRIGHT a Brian W MCBRIDE, 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea (Vancouver, B.C.)* [online]. 12., roč. 2010, s. 945785. ISSN 1472-3654 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1155/2010/945785

IMASE, Kyoto, Motomichi TAKAHASHI, Akifumi TANAKA, Kengo TOKUNAGA, Hajime SUGANO, Mamoru TANAKA, Hitoshi ISHIDA, Shigeru KAMIYA a Shin'ichi TAKAHASHI, 2008. Efficacy of *Clostridium butyricum* preparation concomitantly with *Helicobacter pylori* eradication therapy in relation to changes in the intestinal microbiota. *Microbiology and Immunology* [online]. 3., roč. 52, č. 3, s. 156–61 [vid. 2016-11-10]. ISSN 0385-5600. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402597>

ITO, I, T HAYASHI, A IGUCHI, H ENDO, M NAKAO, S KATO, T NABESHIMA a Y OGURA, 1997. [Effects of administration of *Clostridium butyricum* to patients receiving long-term tube feeding]. *Nihon Ronen Igakkai zasshi. Japanese Journal of Geriatrics*. 4., roč. 34, č. 4, s. 298–304. ISSN 0300-9173 (Print).

JONSSON, Eva a Patricia CONWAY, 1992. Probiotics for pigs. In: *Probiotics: The scientific basis* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 259–316. ISBN 978-94-011-2364-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-2364-8\_11

KONG, Qing, Guo-Qing HE, Ji-Lei JIA, Qi-Long ZHU a Hui RUAN, 2011. Oral administration of *Clostridium butyricum* for modulating gastrointestinal microflora in mice. *Current Microbiology* [online]. 2., roč. 62, č. 2, s. 512–517. ISSN 1432-0991 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1007/s00284-010-9737-8

KRAUSE, Denis O, Stuart E DENMAN, Roderick I MACKIE, Mark MORRISON, Ann L RAE, Graeme T ATTWOOD a Christopher S MCSWEENEY, 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 12., roč. 27, č. 5, s. 663–693. ISSN 0168-6445 (Print).

KUBENA, L F, R H BAILEY, J A BYRD, C R YOUNG, D E CORRIER, L H STANKER a G E ROTTINGHAUST, 2001. Cecal volatile fatty acids and broiler chick susceptibility to *Salmonella typhimurium* colonization as affected by aflatoxins and T-2 toxin. *Poultry Science*. 4., roč. 80, č. 4, s. 411–417. ISSN 0032-5791 (Print).

KUROIWA, T, M IWANAGA, K KOBARI, A HIGASHIONNA, F KINJYO a A SAITO, 1990a. [Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy]. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 11., roč. 64, č. 11, s. 1425–1432. ISSN 0387-5911 (Print).

KUROIWA, T, K KOBARI a M IWANAGA, 1990b. [Inhibition of enteropathogens by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588]. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 3., roč. 64, č. 3, s. 257–263. ISSN 0387-5911 (Print).

LEE, Yuan-Kun a Seppo SALMINEN, 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology* [online]. roč. 6, č. 7, s. 241–245. ISSN 0924-2244. Dostupné z: [doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89085-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89085-8)

LING, Zongxin, Xia LIU, Yiwen CHENG, Yueqiu LUO, Li YUAN, Lanjuan LI a Charlie XIANG, 2015. *Clostridium butyricum* Combined with *Bifidobacterium infantis* Probiotic Mixture Restores Fecal Microbiota and Attenuates Systemic Inflammation in Mice with Antibiotic-Associated Diarrhea. *BioMed Research International* [online]. B.m.: Hindawi Publishing Corporation, 23. 2., roč. 2015, s. 582048. ISSN 2314-6133. Dostupné z: [doi:10.1155/2015/582048](http://dx.doi.org/10.1155/2015/582048)

LUTFUL KABIR, S M, 2009. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. B.m.: Molecular Diversity Preservation International (MDPI), 12. 8., roč. 10, č. 8, s. 3531–3546. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms10083531](http://dx.doi.org/10.3390/ijms10083531)

MAROUNEK, M, V RADA, I RYCHLY a K VORISEK, 1995. Effect of *Lactobacillus salivarius* administration on microflora in the crop and caeca of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*. roč. 4, č. 2, s. 161–170. ISSN 1230-1388.

MATTILA-SANDHOLM, T, P MYLLÄRINEN, R CRITTENDEN, G MOGENSEN, R FONDÉN a M SAARELA, 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* [online]. roč. 12, č. 2–3, s. 173–182. ISSN 0958-6946. Dostupné z: doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1)

MCALLISTER, J S, H J KURTZ a E C Jr SHORT, 1979. Changes in the intestinal flora of young pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *Journal of Animal Science*. 9., roč. 49, č. 3, s. 868–879. ISSN 0021-8812 (Print).

MIKKELSEN, Lene Lind, Christian BENDIXEN, Mogens JAKOBSEN a Bent Borg JENSEN, 2003. Enumeration of Bifidobacteria in Gastrointestinal Samples from Piglets. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. B.m.: American Society for Microbiology, 23. 1., roč. 69, č. 1, s. 654–658. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:[10.1128/AEM.69.1.654-658.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.654-658.2003)

NURMI, E a M RANTALA, 1973. New Aspects of Salmonella Infection in Broiler Production. *Nature* [online]. 19. 1., roč. 241, č. 5386, s. 210–211. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1038/241210a0>

OKAMOTO, T, M SASAKI, T TSUJIKAWA, Y FUJIYAMA, T BAMBA a M KUSUNOKI, 2000. Preventive efficacy of butyrate enemas and oral administration of *Clostridium butyricum* M588 in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *Journal of Gastroenterology*. roč. 35, č. 5, s. 341–346. ISSN 0944-1174 (Print).

PEARSON, G R, M S MCNULTY, R M MCCRACKEN a W CURRAN, 1982. Scanning electron microscopic observations of segmented filamentous bacteria in the small intestine of domestic fowl. *The Veterinary record*. 10., roč. 111, č. 16, s. 366–367. ISSN 0042-4900 (Print).

QUINTERO-GONZALEZ, C I, J W COMERFORD a G A VARGA, 2003. Effects of Direct-Fed Microbials on Growth, Health, and Blood Parameters of Young Holstein Calves. *The Professional Animal Scientist* [online]. B.m.: Elsevier, 17. 11., roč. 19, č. 3, s. 211–220. ISSN 1080-7446. Dostupné z: doi:[10.15232/S1080-7446\(15\)31407-8](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31407-8)

RADA, V a J PETR, 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-

fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*. 12., roč. 43, č. 2, s. 127–132. ISSN 0167-7012 (Print).

RADA, V a I ŠPLÍČHAL, 2010. Probiotika, prebiotika a synbiotika: současný stav a perspektivy využití v živočišné produkci. In: L OPLETAL a V SKŘIVANOVÁ, ed. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. B.m.: Nakladatelství Karolinum, s. 331–360. ISBN 978-80-246-1801-2.

ROBERFROID, Marcel, 2007. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*. 3., roč. 137, č. 3 Suppl 2, s. 830S–7S. ISSN 0022-3166 (Print).

ROBINSON, I M, M J ALLISON a J A BUCKLIN, 1981. Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 4., roč. 41, č. 4, s. 950–955. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243839/>

ROEDIGER, W, 1995. The place of short-chain fatty acids in colonocyte metabolism in health and ulcerative colitis: the impaired colonocyte barrier. In: JH CUMMINGS, JL ROMBEAU a T SAKATA, ed. *Physiological and Clinical Aspects of Short-chain Fatty Acids*. Cambridge. B.m.: Cambridge University Press, s. 337–387.

ROEDIGER, W E, 1980. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* [online]. 9., roč. 21, č. 9, s. 793–798. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1419533/>

SALANITRO, J P, I G BLAKE a P A MUIRHEAD, 1977. Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1., roč. 33, č. 1, s. 79–84. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC170578/>

SEKI, Hiromi, Masaaki SHIOHARA, Tadao MATSUMURA, Natsuki MIYAGAWA, Mamoru TANAKA, Atsushi KOMIYAMA a Susumu KURATA, 2003. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*. 2., roč. 45, č. 1, s. 86–90. ISSN 1328-8067 (Print).

SHIMBO, Izumi, Taketo YAMAGUCHI, Takeo ODAKA, Kenichi NAKAJIMA, Akinori KOIDE, Hidehiko KOYAMA a Hiromitsu SAISHO, 2005. Effect of Clostridium butyricum on fecal flora in Helicobacter pylori eradication therapy. *World Journal of Gastroenterology* [online]. B.m.: Baishideng Publishing Group Inc, 21. 12., roč. 11, č. 47, s. 7520–7524. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v11.i47.7520

TAKAHASHI, Motomichi, Haruhiko TAGUCHI, Hiroyuki YAMAGUCHI, Takako OSAKI, Akio KOMATSU a Shigeru KAMIYA, 2004. The effect of probiotic treatment with Clostridium butyricum on enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* [online]. 7., roč. 41, č. 3, s. 219–226. ISSN 0928-8244 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/j.femsim.2004.03.010

TAKASHI, K, I FUJITA a K KOBARI, 1989. Effects of short chain fatty acids on the production of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic Escherichia coli. *Japanese Journal of Pharmacology*. 8., roč. 50, č. 4, s. 495–498. ISSN 0021-5198 (Print).

TOROK, Valeria A, Robert J HUGHES, Lene L MIKKELSEN, Rider PEREZ-MALDONADO, Katherine BALDING, Ron MACALPINE, Nigel J PERCY a Kathy OPHEL-KELLER, 2011. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 9., roč. 77, č. 17, s. 5868–5878. ISSN 1098-5336 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00165-11

U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2016. *Safety and Clinical Effectiveness of Oral Probiotic MIYA-BM to Prevent Recurrent Clostridium Difficile Infections* [online] [vid. 2016-11-14]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01077245>

VAN IMMERSEEL, Filip, Jeroen DE BUCK, Isabel DE SMET, Frank PASMANS, Freddy HAESBROUCK a Richard DUCATELLE, 2004. Interactions of butyric acid- and acetic acid-treated Salmonella with chicken primary cecal epithelial cells in vitro. *Avian diseases* [online]. roč. 48, č. 2, s. 384–391. ISSN 0005-2086 (Print). Dostupné z: doi:10.1637/7094

VELAZQUEZ, O C, H M LEDERER a J L ROMBEAU, 1997. Butyrate and the colonocyte.

Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. roč. 427, s. 123–134. ISSN 0065-2598 (Print).

YANG, C M, G T CAO, P R FERKET, T T LIU, L ZHOU, L ZHANG, Y P XIAO a A G CHEN, 2012. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry Science* [online]. 1. 9., roč. 91, č. 9, s. 2121–2129. Dostupné z: doi:10.3382/ps.2011-02131

ZHANG, Bingkun, Xin YANG, Yuming GUO a Fangyu LONG, 2011. Effects of dietary lipids and *Clostridium butyricum* on the performance and the digestive tract of broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition*. 8., roč. 65, č. 4, s. 329–339. ISSN 1745-039X (Print).

ZHANG, Hai-Qiang, Tomas T DING, Jun-Sheng ZHAO, Xin YANG, Hai-Xia ZHANG, Juan-Juan ZHANG a Yun-Long CUI, 2009. Therapeutic effects of *Clostridium butyricum* on experimental colitis induced by oxazolone in rats. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [online]. B.m.: The WJG Press, 21. 4., roč. 15, č. 15, s. 1821–1828. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.15.1821

ZHU, Xiang Y, Tanya ZHONG, Yoga PANDYA a Rolf D JOERGER, 2002. 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens . *Applied and Environmental Microbiology* [online]. B.m.: American Society for Microbiology, 26. 1., roč. 68, č. 1, s. 124–137. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.1.124-137.2002