VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i.
Praha Uhříněves

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ
VĚDĚCKÝ VÝBOR VÝŽIVY ZVÍŘAT
KOMISE VÝŽIVY ODBORU ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY ČAZV

AKTUÁLNÍ POZNATKY VE VÝŽIVĚ A ZDRAVÍ ZVÍŘAT A BEZPEČNOSTI PRODUKTŮ 2016

Sborník z konference

22. září 2016

Praha Uhříněves

ISBN 978-80-7403-152-6

OBSAH

PROSPEŠNOSŤ BAKTERIOCÍN-PRODUKUJÚCICH, PROBIOTICKÝCH ENTEROKOKOV A ICH BAKTERIOCÍNOV PRI ODCHOVE ZVIERAT
ANDREA LAUKOVÁ

ÚČINEK MODIFIKOVANÝCH POLYSACHARIDŮ NA METABOLISMUS CHOLESTEROLU U POTKANŮ
MAROUNEK MILAN

STUDIUM SELEKTIVNÍHO ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU 8-HYDROXYCHINOLINU: *C. PERFRINGENS* VS. BIFIDOBAKTERIE
SKŘIVANOVÁ EVA, KOKOŠKA LADISLAV

PROBIOTICKÉ VLASTNOSTI *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*
ŠVEJSTIL ROMAN, RADA VOJTĚCH

HODNOCENÍ KRMIV METODOU POSUZOVÁNÍ ŽIVOTNÍHO CYKLU (TZV. LCA-LIFE CYCLE ASSESSMENT)
ZEMAN LADISLAV, DOLEŽAL PETR, HORKÝ PAVEL, DOČKALOVÁ HANA, TVRZNÍK PAVEL

PROSPEŠNOSŤ BAKTERIOCÍN-PRODUKUJÚCICH, PROBIOTICKÝCH ENTEROKOKOV A ICH BAKTERIOCÍNOV PRI ODCHOVE ZVIERAT

[1]MVDr. Andrea Lauková, CSc., [1]MVDr. Viola Strompfová, Ph.D., Ing. [2]Ľubica Chrastinová, Ph.D., [1]MVDr. Iveta Plachá, Ph.D., [1]RNDr. Anna Kandričáková, [1]RNDr. Jana Ščerbová, [1]MVDr. Ivana Kubašová, [3]MVDr. Eva Styková, Ph.D., [1]MVDr. Monika Pogány Simonová, Ph.D.

[1]Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovenská republika
[2]Národné poľnohospodárske a potravinové centrum, Hlohovecká 2, 951 41 Nitra-Lužianky, Slovenská republika
[3]Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 040 83 Košice, Slovenská republika

V súčasnosti vieme, že niektoré baktérie (najmä tie patriace ku fylu Firmicutes) sú schopné produkovať substancie bielkovinového charakteru s antibakteriálnym účinkom označované termínom bakteriocíny a zároveň tieto baktérie môžu mať probiotické teda prospešné vlastnosti (Nes a kol., 2007; Franz a kol., 2007). Čo sa týka termínu probiotický stále je v platnosti definícia, ktora hovorí, že probiotická baktéria je taká, ktorá svojimi vlastnosťami podávaná v optimálnom množstve prospešne ovplyvňuje zdravie hostiteľa (FAO/WHO, 2002). V deväťdesiatych rokoch nastal rozmach jednak v štúdiu probiotických enterokokov a jednak značný rozmach nastal v štúdiu bakteriocínov produkovaných niektorými zástupcami rodu Enterococcus, čo viedlo ku klasifikácii samotných enterocínov, teda bakteriocínov produkovaných zväčša enterokokmi (Franz a kol., 2007; Nes a kol., 2014). Vo všeobecnosti, purifikované enterocíny zaraďujeme do 4 skupín:1. skupina-sem patria tzv. lantibiotické enterocíny teda také, ktoré vo svojom amínokyselinovom reťazci obsahujú špecifické amínokyseliny lantionín a beta-metyllantionín; 2. skupina-túto skupinu tvoria malé teplo stabilné peptidy, tzv. pediocin-like enterocíny ako napr. enterocín (Ent) A a P, enterocíny syntetizované s tzv. vedúcim (leader) peptidom (Ent Q, Ent L50A), a ďalšie lineárne tzv. non pediocin-like enterocíny (Ent B); 3. skupina-sem patria cyklické antibakteriálne peptidy (Ent AS48) a 4. skupina enterocínov sa označuje termínom bakteriolyzíny (napr. enterolyzín), čo sú väčšinou veľké teplo labilné proteíny (Nes akol., 2014). V rámci rodu *Enterococcus* boli zatiaľ najdetajlnejšie preštudované bakteriocíny produkované rôznymi kmeňmi druhu *Enterococcus faecium* (Lauková a kol., 1993; Cintas a kol., 1998; Herranz a kol., 2001; Franz a kol., 2007; Maldonato-Barragán a kol., 2009), ale aj enterocíny produkované kmeňmi druhu *E. durans* či *E. mundtii*. Samozrejme pre prípadné využitie enterocín-produkujúcich a probiotických kmeňov enterokokov, je dôležité, aby dané kmene spĺňali požiadavky nariadenia Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín – EFSA, ktorý pevne stanovuje určité pravidlá pre využívanie prospešných baktérií, kde je jednoznačnou požiadavkou absencia génov faktorov virulencie a prenosných markerov rezistencie na antibiotiká. Prítomnosť spomínaných génov či markerov jednoznačne vylučuje daný kmeň z akéhokoľvek možného komerčného využitia (Piskoríková, 2010). Je však dôležité podotknúť, že enterocíny nepodliehajú takémuto zhodnocovaniu. O komercializácii bakteriocínov sa v ostatných rokoch veľa hovorí. Tento trend bol jednoznačne potvrdený ešte v roku 2012 na medzinárodnej konferencii o bakteriocínoch „Bakteriocíny a Antimikrobiálne Peptidy-BAMP2012“ v Košiciach (Chikindas a Sutyak, 2012). Bakteriocín-produkujúce, probiotické baktérie boli zväčša študované pre ich využitie v potravinárskom priemysle, avšak

veľmi perspektívne je ich využitie v prevencii zdravia predovšetkým potravinových zvierat, ale aj tzv. zvierat spoločenských. Keďže naše pracovisko sa touto problematikou zaoberá viac rokov, potvrdzujú to aj naše výsledky. V našich štúdiách sledujeme kolonizáciu, stabilitu podávaných kmeňov v tráviacom trakte daného hostiteľa, a ich antimikrobiálny účinok ako aj antimikrobiálny účinok ich bakteriocínov, ale sledujeme aj fagocytárnu aktivitu a ďalšie imunologické parametre, biochemické parametre, produkčné parametre, morfometriu, vplyv na oocysty *Eimeria* spp. (u králikov) ako aj niektoré fyzikálno-chemické vlastnosti mäsa potravinových zvierat. V tejto práci sú zahrnuté niektoré z daných parametrov pri jednotlivých skupinách zvierat.

Aplikácie u hydiny

V rámci hydiny sme uskutočnili viaceré modelové i farmové experimenty s aplikovaním rôznych kmeňov. Aplikovali sme probiotické bakteriocín-produkujúce kmene morkám, kurčatám, ale aj pštrosom, ktoré boli v decembri 1995 (§ 8, časť 1, nariadenie č. 110/1972 o chove hospodárskych zvierat) preradené z kategórie exotických zvierat do kategórie hospodárskych zvierat. Po jednotlivom podávaní bakteriocín-produkujúcich a probiotických kmeňov *Enterococcus faecium* EK13/CCM7419, *E. faecium* EE3 a *E. faecium* EF55, (charakterizované v našom laboratóriu, 10^9 KTJ/ml) v trvaní 7 dní morkám bol zaznamenaný signifikantný pokles koliformných zárodkov ($P<0.01$). Počty podávaných kmeňov v truse moriek na 7. deň dosahovali 10^5 KTJ/g.

Pri sledovaní vhodnosti podávanej formy kmeňa (čerstvá kultúra, či lyofylizovaná) sme u kurčiat jednoznačne zaznamenali skorší efekt (vyššiu kolonizáciu) pri podávaní čerstvej kultúry kmeňa v porovnaní s lyofylizovanou, avšak na 21. deň podávania boli zaznamenané vyššie počty kmeňa *E. faecium* EF55 v skupine s podávaním lyofylizovaného kmeňa *E. faecium* EF55; v céku boli počty kmeňa EF55 na 21. deň vyrovnané. Protektívny účinok kmeňa EF55 u kurčiat infikovaných Salmonelou (v spolupráci s ÚVLF, Košice) bol demonštrovaný signifikantným zvýšením počtu lymfocytov v periférnej krvi, tendenciou vo zvýšení CD3, CD4, CD8 a IgM v skorej fáze infekcie Salmonelou. Kmeň EF55 ovplyvnil aj produkciu mucínu (ochranná bariéra).

Ent M-produkujúci kmeň *E. faecium* AL41/CCM8558 bol aplikovaný nosniciam v dĺžke 3 týždňov. Zaznamenali sme dostatočnú kolonizáciu (takmer 10^3 KTJ/g) v truse nosníc a signifikantné zvýšenie fagocytárnej aktivity v krvi pokusných zvierat v porovnaní s kontrolnými zvaieratami ako aj zvýšenie indexu fagocytárnej aktivity ($p<0.001$). V prípade imunologických parametrov, keď jednodňové kurčatá Cobb 500 (v počte 40) prijímali kmeň AL41 (10^9 KTJ/ml) 7 dní a na 4. deň boli infikované kmeňom *S. Enteritidis* PT fágový typ 167/3 (10^8 KTJ/ml) bol prospešný účinok kmeňa AL41 demonštrovaný na produkciu a sekréciu IgA v čreve; bolo zistené, že IgA zohrávajú významnú úlohu v poklese buniek *S. Enteritidis* v čreve a cytokíny TGF-β4 a IL-17 prispeli ku zvýšenej sekrécii IgA.

Rovnako kmeň AL41 bol aplikovaný 21 dní na farme pštrosím kurčatám (10^9 KTJ/ml). V pokuse bolo 40 pštrosích jedincov (vek 1-3 týždne) a 46 jedincov bolo v kontrolnej skupine. Kmeň AL41 dostatočne kolonizoval tráviaci trakt, aj 3. týždne resp. 21 dní od jeho nepodávanie dosahoval 10^3 KTJ/g. Počty enterokokov boli signifikantne vyššie v PS v porovnaní s KS ($P<0.001$). Antimikrobálny účinok kmeňa AL41 bol demonštrovaný matematickým poklesom v počte koaguláza negatívnych (CoNS) a koaguláza-pozitívnych stafylokokov (CoPS), koliformných baktérií a *Pseudomonas* spp.

Aplikácie u brojlerových králikov

Brojlerové králiky sú nielen vhodným modelovým zvieraťom, ale aj potravinovým zvieraťom, mäso ktorého má svoj význam predovšetkým v tzv. zdravej výžive vzhľadom na jeho nutričné parametre. My sme postupne v sérii mnohých experimentov otestovali produkčné probiotické kmene ako aj ich enterocíny. Zachovávali sme jednotnú schému, podávanie 21 dní, celý experiment trval 42 dní (pre naše parametre). Králiky zaradené do experimentu boli po odstave-vek 5. týždňov, kmene resp. enterocíny boli podávané do vody v prípade kmeňa 500µl/zviera/deň a v prípade enterocínu 50µl/zviera/deň. Vzorky boli odoberané na tzv. 0-1 deň pred začatím podávania aditív, na 21. deň (po 3. týždňoch podávania) a na 42. deň (po 3. týždňoch nepodávania). Odoberaný bol trus, krv a zvieratá boli i zabité (n=3/4 z každej skupiny) a bolo odoberané jejunum, caecum a appendix-obsahy pre ostatné stanovenia, *Musculus longissimus dorsi* (MLS). Celkovo sme zaznamenali vyššie počty podávaných kmeňov v truse (od 10^3-10^5 KTJ/g) než v céku či appendixe králikov a zaznamenali sme signifikantnú alebo matematickú redukciu v počte koliformných zárodkov, CoPS, CoNS, *Clostridium* spp. alebo pseudomonád. Opakovane sme zaznamenali signifikantné zvýšenie fagocytárnej aktivity (FA) nielen na 21. deň teda po podávaní kmeňov či enterocínov, ale aj na konci experimentu teda 3. týždne-21 dní od nepodávania (Tab. 1). Je zaujímavé, že autochtónny kmeň teda izolovaný z trusu králikov *E. faecium* EF2019/CCM7420 síce najlepšie kolonizoval tráviaci trakt králikov (10^5 KTJ/g), ale najvyššiu fagocytárneu aktivitu sme zaznamenali po podávaní kmeňa EF55 (hydinového izolátu) a najvyššiu FA vôbec po podávaní enterocínu M, ktorý je produkovaný kmeňom AL41-environmentálneho pôvodu (Tab. 1). Biochemické parametre, enzým glutationperoxidáza, rastové parametre a vlastnosti mäsa neboli negatívne ovplyvnené, biochemické parametre ako celkové proteíny, cholesterol, enzým ALT boli ovplyvnené v rámci fyziologických hodnôt. Naše pracovisko ako prvé sledovalo morfometrické parametre u králikov po aplikácii bakteriocínu/enterocínu a probiotických kmeňov a rovnako aj ich vplyv na redukciu oocýst *Eimeria* spp. Po aplikácii Ent 4231 (produkovaný kmeňom CCM4231) sme zaznamenali na 21. deň v ES redukciu oocýst oproti 0-1 vzorke, kedy bolo detegovaných 65 oocýst a oproti KS, kde bolo prítomných 1 184 oocýst (OPG/g). V prípade morfometrických parametrov je najdôležitejší pomer výšky klkov ku hĺbke krýpt. Najvyšší bol tento pomer v prípade podávania kmeňa EF55 (PS 5.42, v KS to bolo 3.73), aj po podávaní kmeňa AL41 bol pomer VH:CD vysoký-4.11.

Tab. 1. Hodnoty fagocytárnej aktivity v krvi brojlerových králikov po podávaní bakteriocín-produkujúcich enterokokov a ich enterocínov (% ±SD)
Ent M/AL41;21.deň- a:b –P<0.001; CCM4231:EF2019-21. deň, a:b-P<0.01; 42 deň, AL41:CCM4231,c:a-P<0.001;42.deň, b:d; E. faecium CCM4231, Enterocin 4231, *E. faecium* EF2019/CCM7420, Ent2019, *E. faecium* AL41/CCM8558, Ent M, *E. faecium* EF55, Ent 55, FA-fagocytárna aktivita

FA	CCM4231	CCM 7420/EF2019	AL 41/CCM8558	EF55
Deň 21	37.00 (0.08)[a]	44.33 (0.43)[b]	46.00 (0.85)[b]	51.00 (4.05)
Deň 42	37.00 (0.05)[a]	50.33(1.02)[b]	48.83 (0.60)[c]	53.00 (2.59)[d]
FA	Ent 4231	Ent 2019	Ent M	Ent 55
Deň 21	18.67 (0.42)	26.00 (1.76)	32.20 (0.86)[a]	49. 00 (2.37)
Deň 42	25.20 (0.80)	34.60 (1.72)	68.80 (0.06)[b]	50. 50 (1.05)

Aplikácie u koní

Kone patria medzi športové zvieratá a u majiteľov resp. chovateľov sa stretávame so záujmom o probiotické kmene, keďže majitelia/chovatelia sledujú médiá a majú možnosť dozvedieť sa o rôznych inováciách. Nás tieto aplikácie zaujímajú aj z hľadiska základného výskumu-aká je účinnosť našich kmeňov či ich enterocínov. Kmeň *E. faecium* AL41/CCM8558 resp. jeho Ent M boli aplikované koňom (10/11) rôznych plemien a veku. Predtým takýto experiment s podávaním Enterocínu či probiotického kmeňa z rodu Enterococcus so záberom aj na enzýmy a fagocytárnu aktivitu nebol zaznamenaný, čiže sa jedná opäť o originálne výsledky. Podávanie bolo v období 14 resp. 21 dní do bolusu. V prípade kmeňa AL41 sme zaznamenali opäť dostatočnú kolonizáciu (do 10^3 KTJ/g) a pokles *Aeromonas* sp. na 14. deň oproti kontrolným vzorkám ($P<0.001$); opäť samotné kone pred začatím podávania slúžili ako kontrola. Aj hodnoty FA mali tendenciu zvyšovať sa, aj keď pokus bol krátky-preliminárny. V prípade Ent M sme zaznamenali antimikrobiálny účinok (*Campylobacter* sp., $P<0.05$, *Clostridium* sp. ($P<0.001$) a *Aeromonas* sp. (0.05); ostatné výsledky sa ešte vyhodnocujú.

Aplikácie u psov

Psy patria medzi spoločenské zvieratá, mnohé začínajú strádať na tzv. civilizačné choroby a chov psov alebo držba psov sú v súčasnosti veľmi bežným javom, takže majitelia sa starajú o ich dobrú kondíciu. V rámci enterokokov boli otestované kmene *E. faecium* EE3 (izolovaný z krmiva pre psov), environmentálny kmeň CCM7419 a ruminálny kmeň CCM4231-podávanaie 7-14 dní na začiatku testovaní (10^9 KTJ/ml). Do pokusu bolo zaradených 17 zdravých psov rôznych plemien. Kmeň EE3 bol podávaný 7 dní do stravy, ostatné 14 dní. Počty dosahovali takmer 10^5 KTJ/g, zaznamenali sme pokles stafylokokov a pseudomonád ($p<0.001$), v prípade kmeňa *E. faecium* EK13/CCM7419 aj aeromonád, pseudomonád a *Clostridium* sp. matematicky, rovnako to bolo v prípade kmeňa CCM4231; taktiež sme zaznamenali u individuálnych psov pokles cholestrolu, alebo biochemické hodnoty boli ovplyvnené len vo fyziologických rozmedziach. Samotné psy pri začatí experimentu slúžili ako kontroly. V týchto štúdiách pokračujeme.

Celkové zhrnutie

- Aplikované bakteriocín-produkujúce enterokoky alebo ich enterocíny potvrdili svoje prospešné účinky, t.j. kmene dostatočne kolonizovali tráviaci trakt, prejavili antimikrobiálne účinky, stimulovali fagocytárnu aktivitu, nepôsobili negatívne na biochemické, rastové parametre alebo u potravinových zvierat na kvalitu mäsa. Pravdepodobne svojimi metabolitmi zlepšili podmienky pre reparáciu enterocytov a teda viedli k rýchlejšej reparácii a funkčnosti, viedli k redukcii oocýst *Eimeria* spp.
- Aj keď nie sú známe priamo všetky spôsoby účinku podávaných kmeňov či enterocínov, naše štúdie sú jednak prínosom pre základný výskum, ponechávajú ešte široké pole pôsobnosti pre rozvíjanie týchto štúdií a aplikačným overovaním zároveň poukazujú na možnosti ich praktického využitia najmä ak ide o zdravé potravinové zvieratá, ale aj spoločenské, nakoľko všetko má svoj súvis v raťazci zdravé zviera-zdravé prostedie-zdravý človek.

Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0004/14, 2/0012/16. Poďakovanie patrí tiež ďalším kolegom za spoluprácu a pani Margite Bodnárovej za vynikajúcu laboratórnu prácu. Poďakovanie patrí aj kolektívu Ústavu patologickej anatómie na UVLF, Košice hlavne Doc. Revajovej, Doc. Herichovi a prof. Lavkutovi M., Dr.V. Karaffovej ako aj kolegom z NPPC v Nitre-Dr. R. Žitňanovi, Ing. Z. Formelovej, Ing. Ľ. Ondruškovi, Ing. M. Chrenkovej.

Použitá literatura

Vzhľadom na väčie množstvo literárných údajov, poprosím v prípade záujmu kontaktovať korešpondujúceho autora a literárny zoznam bude poskytnutý. A.Lauková, laukova@saske.sk

ÚČINEK MODIFIKOVANÝCH POLYSACHARIDŮ NA METABOLISMUS CHOLESTEROLU U POTKANŮ

prof. Ing. Milan Marounek, DrSc., Ing. Zdeněk Volek, Ph.D., MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D., Ing. Tomáš Taubner, Ph.D., Ing. Dagmar Dušková

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha 10 - Uhříněves

Vysoká koncentrace sérového cholesterolu se pokládá za rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění. Názor na rizikovou koncentraci sérového cholesterolu se mění. Podle české části studie HAPIEE je nejnižší celková i kardiovaskulární úmrtnost při hladinách celkového cholesterolu mezi 5,15 a 6,18 mmol/l, což byly dříve hodnoty již rizikové (Hubáček a kol. 2016). K léčbě hypercholesterolemie se používá několik léků, zejména statiny, což jsou inhibitory klíčového enzymu syntézy cholesterolu, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasy. Používá se také ezetimib, inhibitor vstřebávání cholesterolu, obvykle v kombinaci se statimy. Je řada dalších prostředků ke snížení cholesterolemie (Farmer a Gotto 1995). Za zmínku stojí sekvestranty žlučových kyselin (cholestyramin a colestipol), což jsou syntetické pryskyřice, které ve střevu váží žlučové kyseliny a zvyšují jejich fekální exkreci. Následně cholesterolemie klesá (Nazir a kol. 1972). Je možno zmínit i psyllium, indický jitrocel (*Plantago ovata*), což je podpůrný prostředek při léčbě obezity s hypocholesterolemickým účinkem. Psyllium zvyšuje viskozitu střevního obsahu a ztěžuje vstřebávání lipidů.

Pokusy s amidovaným pektinem

Alternativou k sekvestrantům žlučových kyselin jsou hydrofobně modifikované polysacharidy, sorbující cholesterol a jiné neutrální steroly. Detailně jsme se zabývali amidovaným pektinem, který byl připraven amino-de-alkoxylací citrusového pektinu N-oktadecylaminem podle Synytsya a kol. (2004). K pokusům jsme používali potkany. Zde uvádíme výsledky pokusu s vlivem přídavku amidovaného pektinu na cholesterol v séru a játrech potkanů (Marounek a kol. 2013). Amidovaný pektin jsme přidávali v množství 0, 20, 40 a 60 g/kg do krmné směsi s obsahem cholesterolu a palmového tuku (Tab. 1).

Tab. 1. Diety potkanů v pokusech s amidovaným pektinem

g/kg	Dieta				
	1	2	3	4	5
Cholesterol	0	10	10	10	10
Amidovaný pektin	0	0	20	40	60
Palmový tuk	60	50	50	50	50
Celulosa	60	60	40	20	0
Krm. směs ST-1	880	880	880	880	880

Za 4 týdny byli potkani usmrceni. Vzorky séra, jater a exkrementů byly analyzovány. Na příjem krmiva a růst neměl amidovaný pektin vliv. Výrazný vliv měl na sérové lipidy, cholesterol v játrech a tuk v exkrementech (Tab. 2).

Tab. 2. Účinky amidovaného pektinu (4 týdny podávání)

Dieta	1	2	3	4	5
Cholesterol (g/kg)	0	10	10	10	10
Amidovaný pektin (g/kg)	0	0	20	40	60

Sérum					
celk. cholesterol (µmol/ml)	1,70[b]	3,32[a]	1,73[b]	1,57[b]	1,23[b]
LDL cholesterol (µmol/ml)	0,02[c]	1,09[a]	0,17[b]	0,17[b]	0,12[b]
triglyceridy (µmol/ml)	1,63[ab]	2,35[a]	1,46[ab]	1,36[ab]	1,00[b]
Cholesterol v játrech (µmol/g)	5,45[c]	16,74[a]	8,57[b]	6,69[c]	7,17[c]
Fekální lipidy (mg/g)	24,2[a]	37,1[b]	-	-	56,2[c]

Doplnění diety o cholesterol zvýšilo významně cholesterol v séru, játrech a tuk v exkrementech. Přídavek amidovaného pektinu vrátil sérový a jaterní cholesterol na původní hodnoty.

V dalším pokuse jsme prokázali, že hypocholesterolemický účinek amidovaného pektinu přetrvává i při době podávání 3 měsíce. Amidovaný pektin byl v dietě potkanů v množství 20 g/kg. Došlo ale ke zvýšení aktivity aspartátové aminotransferasy (Tab. 3).

Tab. 3. Účinky amidovaného pektinu (3 měsíce podávání)

Dieta	1	2	3
Cholesterol (g/kg)	0	10	10
Amidovaný pektin (g/kg)	0	0	20
Sérum			
celk. cholesterol (µmol/ml)	2,08[b]	3,16[a]	1,38[b]
LDL-cholesterol (µmol /ml)	0,15[b]	0,98[a]	0,06[b]
triglyceridy (µmol/ml)	1,08[b]	1,78[a]	0,82[b]
AST (nkat/ml)	2,55[b]	2,95[ab]	3,55[a]
ALT (nkat/ml)	1,07	1,04	1,16
Tkáň jater			
cholesterol (µmol/g)	6,36[b]	14,38[a]	6,56[b]
celkové lipidy (mg/g)	67,5[b]	113,6[a]	65,0[b]

Podobné výsledky jsme získali s hydrofobně modifikovanými celulosami: amidovanou oxidovanou monokarboxycelulosou a amidovanou karboxymethyl celulosou (Tůma a kol. 2014). Neosvědčil se palmitoylchitosan. Esterová vazba kyseliny palmitové nebyla v prostředí trávicího traktu stabilní (na rozdíl od vazby amidové).

Srovnání amidovaných polysacharidů a psyllia

Hypocholesterolemický účinek mohou mít i hydrofilní polysacharidy nebo jim podobné látky, které zvyšují viskozitu střevního obsahu a ztěžují vstřebávání lipidů. Příkladem může být komerčně dostupné psyllium, které ruší enterohepatální cirkulaci sterolů (Gunness a Gidley 2010). Srovnali jsme účinky psyllia s účinky amidovaného pektinu a amidované karboxymethylcelulosy (Marounek a kol. 2016).

Tab. 4. Diety potkanů s psylliem a amidovanými polysacharidy

g/kg	Dieta				
	1	2	3 (AC)	4 (AP)	5 (Psy)
Cholesterol	0	10	10	10	10
Amid. celulosa	0	0	30	0	0
Amid. pektin	0	0	0	30	0
Psyllium	0	0	0	0	30
Palmový tuk	60	50	50	50	50
Celulosa	30	30	0	0	0
Krm. směs ST-1	910	910	910	910	910

Po třech týdnech byl pokus ukončen, odebrány vzorky séra, tkáně jater, exkrementů a zváženo slepé střevo. Výsledky analýz jsou v Tab. 5 a Tab. 6.

Tab. 5. Účinky amidované celulosy (AC), amidovaného pektinu (AP) a psyllia (Psy)

Dieta	1[a]	2[a]	3 (AC)	4 (AP)	5 (Psy)
Sérum					
celk. cholesterol (µmol/ml)	1,97[bc]	2,60[b]	1,87[c]	1,85[c]	2,27[bc]
LDL-cholesterol (µmol/ml)	0	0,50[b]	0,06[c]	0,03[c]	0,32[bc]
triglyceridy (µmol/ml)	2,05	1,96	1,72	1,63	1,53
Tkáň jater					
cholesterol (µmol/g)	5,19[b]	23,40[c]	8,29[d]	6,47[bd]	9,22[d]
celk. lipidy (mg/g)	70,3[b]	119,8[c]	68,9[b]	73,2[b]	73,7[b]
Váha slep. střeva (g)	5,29[b]	4,92[b]	5,56[b]	5,57[b]	7,43[c]

[a] kontrolní diety

Dle očekávání, doplněk cholesterolu zvýšil koncentraci cholesterolu v séru, játrech a celkové lipidy v játrech. Oba amidované polysacharidy vrátily tyto hodnoty na výchozí úroveň. Slabý hypocholesterolemický účinek psyllia nebyl statisticky významný, psyllium však signifikantně snížilo koncentrace cholesterolu a lipidů v játrech.

Afinitu psyllia k vodě dokládá významné zvýšení hmotnosti slepého střeva.

Výsledky analýz exkrementů jsou v Tab. 6.

Tab. 6. Účinky amidované celulosy (AC), amidovaného pektinu (AP) a psyllia (Psy). Denní fekální vyloučení lipidů.

	Dieta				
	1[a]	2[a]	3 (AC)	4 (AP)	5 (Psy)
Tuk (mg)	283	322	358	361	385
Cholesterol (µmol)	19[b]	224[c]	247[c]	334[d]	252[c]
Neutr. steroly (µmol)	50[b]	307[c]	314[c]	405[d]	315[c]
Žluč. kyseliny (µmol)	17[b]	41[cd]	38[d]	51[c]	52[c]
Celkové steroly (µmol)	67[b]	348[c]	352[c]	456[d]	367[c]

[a] kontrolní diety

Fekální vyloučení tuku nejvíce zvýšilo psyllium. Variabilita nálezů, která je u tohoto stanovení vyšší neumožnila dosáhnout statistické významnosti. Signifikantní však bylo zvýšení exkrece cholesterolu (potažmo i neutrálních a celkových sterolů) u potkanů přijímajících amidovaný pektin. Snížení cholesterolemie u těchto potkanů je tudíž důsledkem přerušení enterohepatální cirkulace cholesterolu.

Pokusy a amidovaným alginátem

Alginát je kopolymer β-D-mannuronátu a α-L-guluronátu s vazbou α-1-4 (Aspinall 1970). Je součástí buněčných stěn mořských hnědých řas. Má použití v řadě odvětví, v potravinářství, farmacii, výrobě textilu. V trávicím traktu zvyšuje viskozitu tráveniny a ztěžuje vstřebání tuku a cholesterolu. Fyziologické účinky alginátu jsou podobné účinkům pektinu, což je také polymer uronových kyselin, zejména kyseliny D-galakturonové. V pokuse s potkany byl hypocholesterolemický účinek pektinu nevýrazný, ale oktadecylamidací (tj. přeměnou hydrofilní sloučeniny na lipofilní) se mnohem zvýšil (Marounek a kol. 2007). Uvádíme proto srovnání alginátu a amidovaného alginátu v pokusech s potkany. Amidovaný alginát byl připraven z alginátu (Sigma-Aldrich) po esterifikaci methanolem a amino-de-alkoxylaci N-oktadecylaminem. Koncentrace alginátu a amidovaného alginátu v krmné směsi byla 20 g/kg (Tab. 7).

Tab. 7. Dieta potkanů v 1. pokuse s amidovaným alginátem

	Dieta			
	1	2	3	4
Cholesterol	0	10	10	10
Alginát	0	0	20	0
Amidovaný alginát	0	0	0	20
Palmový tuk	60	50	50	50
Celulosa	20	20	0	0
Krm. směs ST-1	920	920	920	920

Za 3 týdny byli potkani usmrceni. Vzorky séra a tkáně jater byly analyzovány. Výsledky uvádí Tab. 8.

Tab. 8. Srovnání alginátu (A) s amidovaným alginátem (AA)

Dieta	1[a]	2[a]	3 (A)	4 (AA)
Sérum				
celk. cholesterol (µmol/ml)	2,27[bd]	2,93[c]	2,70[bc]	2,00[d]
triglyceridy (µmol/ml)	1,27[bc]	1,66[b]	1,79[b]	0,92[c]
Tkáň jater				
cholesterol (µmol/g)	5,42[b]	17,52[c]	13,08[d]	5,86[b]
celkové lipidy (mg/g)	47,9[b]	65,5[c]	71,5[c]	51,7[b]

[a] Kontrolní diety

Na sérové lipidy (cholesterol a triglyceridy) neměl alginát vliv. Snížil pouze koncentraci cholesterolu v tkáni jater o 25%. Naproti tomu amidovaný alginát signifikantně snížil sérový cholesterol i triglyceridy a cholesterol a celkové lipidy v tkáni jater. Snížení sérového cholesterolu a triglyceridů bylo dokonce pod úroveň negativní kontroly.

V 2. pokuse s amidovaným alginátem jsme porovnávali účinky při různém dávkování a analýzy rozšířili o rozbory exkrementů. Amidovaný alginát byl v krmivu v množství 0, 10, 20 a 40 g/kg (Tab. 9).

Tab. 9. Diety potkanů v 2. pokuse s amidovaným alginátem

g/kg	Dieta				
	1	2	3	4	5
Cholesterol	0	10	10	10	10
Amid. alginát	0	0	10	20	40
Palmový tuk	60	50	50	50	50
Celulosa	40	40	30	20	0
Krm. směs ST-1	900	900	900	900	900

Doba trvání pokusu byla 3 týdny. Pět dnů před koncem byly sbírány exkrementy, zváženy a uchovány do doby analýzy při -40°C. Tab. 10 uvádí výsledky analýz séra a tkáně jater.

Tab. 10. Účinek amidovaného alginátu při rostoucím obsahu v krmivu. Analýzy séra a tkáně jater

Dieta	1	2	3	4	5
Cholesterol (g/kg)	0	10	10	10	10
Amidovaný alginát (g/kg)	0	0	10	20	40
Sérum					
celk. cholesterol (µmol/ml)	2,04[a]	2,82[b]	2,00[a]	1,95[a]	1,63[a]
triglyceridy (µmol/ml)	0,97[ab]	1,30[ab]	1,34[ab]	1,43[a]	0,70[b]
Tkáň jater					
cholesterol (µmol/g)	5,42[a]	15,36[b]	9,33[c]	7,81[cd]	6,30[d]
celkové lipidy (mg/g)	50,5	70,3	60,6	50,2	61,9

Amidovaný alginát již v nejnižší koncentraci (10 g/kg) signifikantně snížil cholesterolemii na úroveň negativní kontroly. (Tab. 10). Rovněž signifikantně snížil cholesterol v játrech, sérové triglyceridy však až při nejvyšší koncentraci (40 g/kg). Další tabulka č. 11 uvádí výsledky analýz exkrementů.

Tab. 11. Účinek amidovaného alginátu při rostoucím obsahu v krmivu. Analýzy exkrementů.

Dieta	1	2	3	4	5
Cholesterol (g/kg)	0	10	10	10	10
Amid. alginát (g/kg)	0	0	10	20	40
Koncentrace lipidů (mg/g)	$62,3^{a}$	$51,7^{a}$	$67,6^{a}$	$90,8^{b}$	$117,6^{c}$
Vyloučení lipidů (mg/den)	332^{a}	319^{a}	394^{ab}	507^{b}	685^{c}
Vyloučení lipidů (% příjmu)	$21,2^{a}$	$20,0^{a}$	$25,0^{ab}$	$32,0^{b}$	$44,6^{c}$
Cholesterol (µmol/g DM)	$2,9^{a}$	$40,2^{b}$	$46,7^{bc}$	$47,3^{bc}$	$51,2^{c}$
Neutr. steroly (µmol/g DM)	$10,1^{a}$	$56,8^{b}$	$64,2^{b}$	$70,0^{bc}$	$78,7^{c}$
Žluč. kyseliny (µmol/g DM)	$4,3^{a}$	$11,1^{b}$	$7,3^{c}$	$7,7^{cd}$	$8,7^{d}$
Celkové steroly (µmol/g DM)	$14,4^{a}$	$67,9^{b}$	$71,5^{b}$	$77,7^{bc}$	$87,4^{c}$

Výsledky ukazují, že amidovaný alginát zvýšil koncentraci celkových lipidů v exkrementech úměrně dávkování. Při nejvyšším dávkování (40 g/kg) zvýšil koncentraci lipidů v exkrementech více než dvojnásobně. Amidovaný alginát měl malý vliv na exkreci cholesterolu a neutrálních sterolů vyjma nejvyšší použité koncentrace. Amidovaný alginát snížil fekální exkreci žlučových kyselin, zjevně z důvodu snížené dostupnosti tuku. Mezi ztrátou tuku v exkrementech a cholesterolemií byla signifikantní negativní korelace (r - 0,451; P = 0,0124). Potvrzuje se názor, že saturovaný tuk má větší vliv na sérový cholesterol než cholesterol diety (Lichtenstein a kol. 1998).

Práce byla podpořena granty MZE 0002701404, GAČR 525/03/0358, GAČR P503/11/2479.

Celkové shrnutí

- Oba zdroje tzv. rozpustné vlákniny - alginát a psyllium (*Plantago ovata*) měly jen malý účinek na cholesterol v séru, ve srovnání s hydrofobně modifikovaným pektinem a alginátem.
- Fysiologické účinky obou modifikovaných polysacharidů byly podobné. Hypocholesterolemický účinek amidovaného pektinu se ale primárně odvozuje z přerušení enterohepatální cirkulace cholesterolu, avšak účinek amidovaného alginátu lze přičíst v prvé řadě velké ztrátě tuku v exkrementech.

Použitá literatura

Aspinall G.O. (1970). Polysaccharides. Pergamon Press, Oxford.

Farmer J.A., Gotto A.M. (1995). Currently available hypolipidaemic drugs and future therapeutic developments. Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 9: 825-847.

Gunness P., Gidley M.J. (2010). Mechanisms underlaying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. Food Funct. 1: 149-155.

Hubáček J.A., Kubínová R., Peasey A., Bobak M., Pikhart H. (2016). Celková a kardiovaskulární mortalita ve vztahu k plasmatickým lipidům. Česká část studie HAPIEE. 5. Česká lipidomická konference, Praha 2016.

Lichtenstein A.H., Kennedy E., Barrier P., Danford D., Ernst N.D., Grundy S.M., Leveille G.A., Van Horn L., Williams C.L., Booth S.L. (1998). Dietary fat consumption and health. Nutr. Rev. 56: S3-S19.

Marounek M., Volek Z., Dušková D., Tůma J., Taubner T. (2013). Dose-response efficacy and long-term effect of the hypocholesterolemic effect of octadecylpectinamide in rats. Carb. Polym. 97: 772-775.

Marounek M., Volek Z., Skřivanová E., Taubner T., Dušková D. (2016). Comparative study on the hypocholesterolemic activity of amidated polysaccharides and psyllium. BioResources 11: 365-372.

Marounek M., Volek Z., Synytsya A., Čopíková J. (2007). Effect of pectin and amidated pectin on cholesterol homeostasis and cecal metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. Physiol. Res. 56: 433-442.

Nazir D.J., Horlick L., Kudchodkar B.J., Sodhi H.S. (1972). Mechanisms of action of cholestyramine in the treatment of hypercholesterolemia. Circulation 46: 95-102.

Synytsya A., Čopíková J., Marounek M., Mlčochová P., Sihelníková L., Skoblya S., Havlátová H., Matějka P., Maryška M., Machovič V. (2004). N-oktadecylpectinamide, a hydrophobic sorbent based on modification of highly methoxylated citrus pectin. Carb. Polym. 56:169-179.

Tůma J., Volek Z., Synytsya A., Dušková D., Marounek M. (2014). Hydrophobically modified celluloses as novel cholesterol-lowering polymers. BioResources 9: 4266-4273.

STUDIUM SELEKTIVNÍHO ANTIBAKTERIÁLNÍHO ÚČINKU 8-HYDROXYCHINOLINU: *C. PERFRINGENS* VS. BIFIDOBAKTERIE

[1,2]doc. MVDr. Eva Skřivanová, [3]prof. Ing. Ladislav Kokoška, Ph.D.

[1]Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha
[2]Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
[3]Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta tropického zemědělství

Abstrakt

Nekrotická enteritida drůbeže, infekční onemocnění způsobené bakterií *Clostridium perfringens*, představuje v chovech drůbeže závažný problém. Naším cílem bylo nalézt látku, která průkazně sníží počty *C. perfringens*, ale neovlivní prospěšnou ileální mikrobiotu kuřat (v tomto případě počty bifidobakterií). Jako experimentální model jsme zvolili *in vitro* inkubace ileálních obsahů kuřat, s inokulem klinického izolátu *C. perfringens* 56. Inkubace proběhly v médiu s obsahem autoklávovaného, nebo nativního ileálního obsahu. Testovány byly čtyři koncentrace 8-hydroxychinolinu (8HQ), tj. látky, u níž byly v předchozích experimentech *in vitro* pozorovány jisté selektivní antiklostridiální účinky. Inkubace autoklávovaného ileálního obsahu, obsahujícího známé množství bifidobakterií a *C. perfringens*, prokázala selektivní účinek 8HQ ve všech testovaných koncentracích (32 – 2048 µg/mL). Na rozdíl od *C. perfringens*, kde byly po 3h a 24h inkubaci počty statisticky průkazně redukovány ($p \leq 0,01$), neměly dané koncentrace průkazný vliv na redukci bifidobakterií. Použitá kontrola (Penicilin G) tento selektivní účinek nevykazovala. Selektivní účinek byl dále potvrzen i v případě inkubace nativních ileálních obsahů (inkubační doba 30min a 3h). Výsledky poukazují na možné využití 8HQ jako selektivního antiklostridiálního činidla. Nicméně 8HQ bude nutno prověřit v navazujících experimentech, zejména z hlediska jeho toxicity. Rovněž bude nutné realizovat experimentální NE kuřat.

Úvod

Redukce výskytu *Clostridium perfringens*, původce Nekrotické enteritidy drůbeže (NE) je v současné době velmi aktuálním zdravotním i ekonomickým aspektem drůbeží produkce. Jedním z faktorů přispívajících k indukci NE je bezesporu i nerovnováha střevní mikrobioty daných zvířat. Zejména proto, že kolonizace a následná proliferace v tenkém střevu je hlavním předpokladem úspěšné infekce NE, je přítomnost bakterií typu *Lactobacillus* spp., nebo *Bifidobacterium* spp. v dostatečném počtu střevního obsahu více než žádoucí (Fuller, 2001). NE je v současné době kontrolována veterinárními preparáty na bázi antibiotik. Ty však zpravidla nejsou selektivní a redukují i počty výše zmíněných prospěšných bakterií, také však je třeba brát na zřetel problematiku nadužívání antibiotik, která je stále velmi aktuálním problémem (Clemente *et al*., 2012; Ubeda and Pamer, 2012).
Jednou z alternativ ke konvenčním antibiotikům jsou rostlinné extrakty, jejichž nepřeberná škála zahrnuje i takové preparáty, u nichž lze pozorovat jisté selektivní antiklostridiální účinky. Jedním z kandidátů je 8-hydroxychinolin (8HQ), jehož antiklostridiální účinky již byly v literatuře popsány v experimentech *in vitro* (Kim *et al.*, 2006; Novakova *et al.*, 2013).

Cílem této práce bylo navázat na *in vitro* stanovení minimálních inhibičních koncentrací s využitím komplexnějšího přístupu, jímž byla inkubace různých koncentrací 8HQ v prostředí ileálních obsahů kuřat, záměrně inokulovaných *C. perfringens* a zástupci rodu *Bifidobacterium*.

Materiál a metody

Pro simulaci podmínek v tenkém střevě kuřat byla použita metoda *in vitro* inkubace směsného ileálního obsahu následovně: kompozitní vzorek 30 ileálních obsahů zdravých brojlerových kuřat Ross 308 ve věku 35 dnů byl po aseptickém odběru zředěn 1:1 s pufrovaným neselektivním médiem (Wilkins Chalgren Broth, Oxoid) ve vzduchotěsných penicilinových lahvičkách, obsahujících 4 různé koncentrace 8HQ (32 – 2048 µg/mL). Směs byla prosycena CO_2 a autoklávována, nebo ponechána nativní. V případě autoklávovaného obsahu byl každý triplikát následně inokulován jednou z těchto bakterií, výsledná koncentrace 10^7 CFU/ml: *C. perfringens* CIP 105178 (Collection of Institut Pasteur, Francie). *C. perfringens* CCM 4435, *B. animalis* CCM 4988 (Česká sbírka mikroorganismů, Česká republika), *C. perfringens* 56 (Univerzita v Gentu, Belgie), *B. longum* TP1 (Česká zemědělská univerzita v Praze, Česká republika), *B. gallinarum* DSM 20670 (Leibniz-Institute DSMZ, Německo). V případě nativních vzorků bylo inokulováno pouze klinickým izolátem *C. perfringens* 56, rezistentním na rifampicin. Po inkubaci (30min, 3h nebo 24h) byly stanoveny počty bifidobakterií a *C. perfringens* kultivačně na selektivních médiích (modifikovaný Wilkins chalgren agar s mupirocinem; Rada a Petr, 2000) pro stanovení bifidobakterií a TSC agar (Oxoid) pro stanovení *C. perfringens*. V případě nativních vzorků byly stanoveny počty všech *C. perfringens* a rifampicin-rezistentních *C. perfringens* (TSC agar s přídavkem rifampicinu).

Výsledky a diskuse

Inkubace 8HQ v prostředí autoklávovaných ileálních obsahů, záměrně inokulovaných výše zmíněnými bakteriemi, prokázala jasný selektivní antiklostridiální efekt. Výsledek se dostavil již po 3h inkubaci (Tabulka 1) a setrval i po dobu 24h inkubace (výsledky na vyžádání u autorů). Po tříhodinové inkubaci všechny testované koncentrace 8HQ (32 – 2048 µg/mL) statisticky průkazně ($p \leq 0{,}01$) redukovaly počty *C. perfringens*, nikoli však počty *B. longum* (v porovnání s kontrolou, tj. koncentrace 8HQ = 0). U *B. gallinarum* a *B. animalis* byla průkazná redukce pozorována pouze u nejvyšší testované koncentrace (8HQ = 2048 µg/mL). Antibiotická kontrola (Penicilin G) tento selektivní účinek neprokázala ($p \leq 0.01$).

Výsledky byly dále potvrzeny u vzorků nativních ileálních obsahů při inkubaci 30min (Tab. 2) a 3h (výsledky na vyžádání u autorů). S výjimkou nejnižší koncentrace penicilinu (0.25 µg/mL) byly po 30min inkubaci průkazně redukovány počty bifidobakterií. Na rozdíl od penicilinu 8HQ bifidobakterie průkazně nesnížil ($p \geq 0.01$), na rozdíl od *C. perfringens*, jehož počty průkazně snížily dvě koncentrace 8HQ (512 and 2048 µg/mL). Po inkubaci po dobu 3h byly výsledky obdobné.

Naše výsledky navazují na předchozí zjištění selektivních antiklostridiálních účinků 8HQ (Kim *et al.,* 2006; Jeon *et al.*, 2009; Novakova *et al.*, 2013; 2014; 2016). Žádný z autorů však nerealizoval experiment v prostředí ileálních obsahů kuřat, které lépe charakterizuje reálnou situaci. Velmi žádoucí by bylo navázat experimentální infekcí kuřat, která by výsledky mohla potvrdit. Indukce NE u kuřat je však velmi problematická a vyžaduje značné zkušenosti, rovněž je třeba zohlednit celou řadu faktorů, které by výsledky mohly zkreslit. Dalším aspektem je bezpečnost 8HQ, kterou bude třeba detailněji prostudovat. V současné době je známo, že 8HQ vykazuje poměrně nízkou akutní toxicitu pro potkany (LD_{50} = 1,2 g/kg; Gosselin *et al.*, 1984), taktéž u myší byla sledována nízká toxicita (Duarte *et al.*, 2016). Pro úspěšné použití 8HQ mluví i fakt, že látka je již ve veterinárním lékařství používána (Fox and Norrel, 1994, Magyar *et al.*, 1989).

Tabulka 1. Účinky 8-hydroxychinolinu (8HQ) a Penicilinu G v prostředí sterilního ileálního obsahu kuřat inokulovaného známou koncentrací *C. perfringens* a bifidobakterií (CFU/g)[a] po 3 h inkubaci při 42°C

	Koncentrace (µg/mL)	*C. perfringens* 56	*C. perfringens* CCM 4435	*C. perfringens* CIP 105178	*B. longum* TP1	*B. animalis* CCM 4988	*B. gallinarum* DSM 20670
8HQ	32	6,27 ± 0,25*	6,35 ± 0,35*	6,62 ± 0,59*	7,46 ± 0,33	7,07 ± 0,50	6,95 ± 0,16
	128	5,60 ± 0,36*	5,75 ± 0,26*	6,48 ± 0,50*	7,65 ± 0,11	6,84 ± 0,78	6,95 ± 0,07
	512	4,75 ± 0,36*	4,80 ± 0,34*	4,89 ± 0,59*	7,28 ± 0,44	6,85 ± 0,83	6,75 ± 0,28
	2048	3,63 ± 0,06*	3,71 ± 0,34*	3,70 ± 0,72*	6,97 ± 0,86	6,60 ± 0,21*	6,17 ± 0,21*
Penicilin G	0,25	5,85 ± 0,59*	5,90 ± 0,17*	5,98 ± 0,29*	7,30 ± 0,29	6,95 ± 0,33	6,69 ± 0,86*
	1	5,58 ± 0,80*	5,52 ± 0,54*	4,73 ± 0,38*	6,94 ± 0,34*	6,67 ± 0,35*	6,42 ± 0,75*
	4	5,75 ± 0,74*	5,83 ± 0,41*	4,57 ± 0,51*	6,65 ± 0,37*	6,34 ± 0,35*	6,73 ± 0,95*
	16	4,74 ± 0,81*	5,56 ± 0,54*	4,05 ± 0,10*	6,56 ± 0,49*	6,40 ± 0,15*	6,17 ± 0,32*
Pozitivní kontrola[b]	0	7,37 ± 0,54	7,39 ± 0,34	7,39 ± 0,53	7,67 ± 0,32	7,08 ± 0,34	7,16 ± 0,38
Negativní kontrola[c]	0	< 2*	< 2*	< 2*	< 2*	< 2*	< 2*

[a]Colony forming units, průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů

[b]Inokulované vzorky bez přídavku 8HQ nebo penicilinu

[c]neinokulované vzorky bez přídavku 8HQ nebo penicilinu

*Výsledky ve sloupci se průkazně liší od pozitivní kontroly ($p \leq 0,01$)

Tabulka 2. Účinky 8-hydroxychinolinu (8HQ) a penicilinu v prostředí nativního ileálního obsahu kuřat inokulovaného známou koncentrací *C. perfringens* 56 (CFU/g)[a] po 30min inkubaci při 42°C

	Koncentrace (µg/mL)	*C. perfringens* celkem	*C. perfringens* RIF rezistentní	*Bifidobacterium spp.*
8HQ	32	6,82 ± 0,57*	6,52 ± 0,73*	6,94 ± 0,71
	128	3,55 ± 0,51*	3,43 ± 0,71*	6,86 ± 0,58
	512	< 2*	< 2*	6,96 ± 0,77
	2048	< 2*	< 2*	6,56 ± 0,79
Penicilin G	0,25	6,14 ± 0,31*	6,23 ± 0,41*	6,20 ± 0,72
	1	6,02 ± 0,23*	6,15 ± 0,42*	5,88 ± 0,34*
	4	6,04 ± 0,49*	6,03 ± 0,86*	5,96 ± 0,56*
	16	5,79 ± 0,45*	5,82 ± 0,50*	5,86 ± 0,35*
Pozitivní kontrola[b]	0	7,67 ± 0,56	7,55 ± 0,44	6,47 ± 0,92
Negativní kontrola[c]	0	3,27 ± 0,37*	< 2*	6,59 ± 0,59
Kontrola růstu[d]	0	8,12 ± 0,59	8,17 ± 0,68	< 2*

[a]Colony forming units, průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů
[b]Medium : ileální obsah (1:1), inokulováno *C. perfringens* 56
[c]Medium : ileální obsah (1:1), bez inokulace
[d]Medium bez ileálního obsahu, inokulováno *C. perfringens* 56
*Hodnoty v totožném sloupci se statisticky průkazně liší od pozitivní kontroly ($p \leq 0,01$)

Závěr

Předložené výsledky potvrzují selektivní antiklostridiální účinky 8HQ v komplexním prostředí ileálního obsahu brojlerových kuřat a poukazují na jeho možné využití ve veterinárním lékařství.

Poděkování

Práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky, projekt č. MZERO0716.

Reference

Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., Knight, R., 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell 148, 1258–1270.

Duarte, M.C., dos Reis Lage, L.M., Lage, D.P., Mesquita, J.P., Salles, B.C.S., Lavorato, S.N., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., Alves, R.J., Tavares, C.A.P., Tempone, A.G., Coehlo, E.A., F., 2016. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against Leishmania species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. Vet. Parasitol. 217, 81–88.

Fox, L.K., Norell, R.J., 1994. Staphylococcus aureus colonization of teat skin as affected by postmilking teat treatment when exposed to cold and windy conditions. J. Dairy Sci. 77, 2281–2288.

Fuller, R., 2001. The chicken gut microflora and probiotic supplements. J. Poult. Sci. 38, 189–196.

Gosselin, R.E., Smith, R.P., Hodge, H.C., 1984. Clinical Toxicology of Commercial Products. 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, p. II-383.

Jeon, J.H., Lee, C.H., Lee, H.S. 2009. Antimicrobial activities of 2-methyl-8-hydroxyquinoline and its derivatives against human intestinal bacteria. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 52, 202–205.

Kim, Y.M., Jeong, E.Y., Lim, J.H., Lee, H.S., 2006. Antimicrobial effects of 8-quinolinol. Food Sci. Biotechnol. 15 (5), 817–819.

Magyar, K., Varga, J., Ferenc, S., nee Lauko, H.S., Fekete, P., Romvary, A., Egri, J., nae Someg, K.Z., 1989. Synergistic veterinary composition and/or fodder premix and process for preparing same. U.S. Patent No. 4,871,722. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Novakova, J., Vlkova, E., Bonusova, B., Rada, V., Kokoska, L., 2013. In vitro selective inhibitory effect of 8-hydroxyquinoline against bifidobacteria and clostridia. Anaerobe 22, 134–136.

Novakova, J., Dzunkova, M., Musilova, S., Vlkova, E., Kokoska, L., Moya, A., D'Auria, G., 2014. Selective growth-inhibitory effect of 8-hydroxyquinoline towards Clostridium difficile and Bifidobacterium longum subsp. longum in co-culture analyzed by flow cytometry combined with fluorescent in situ hybridization. J. Med. Microbiol. 63, 1663–1669.

Novakova, J., Vlkova, E., Salmonova, H., Pechar, R., Rada, V., Kokoska, L., 2016. Anticlostridial agent 8- hydroxyquinoline improves the isolation of faecal bifidobacteria on modified Wilkins–Chalgren agar with mupirocin. Lett. Appl. Microbiol. 62, 330–335.

Rada V., Petr J., 2000. A new selective medium for the isolation of glucose nonfermenting bifidobacteria from hen caeca. J. Microbiol. Meth. 43, 127–32.

Ubeda, C., Pamer, E.G., 2012. Antibiotics, microbiota, and immune defense. Trends Immunol. 33, 459–466.

PROBIOTICKÉ VLASTNOSTI *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM*

Ing. Roman Švejstil, prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Abstrakt

Miya-Gold® je krmné aditivum obsahující spory probiotického kmene bakterie *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 jako účinnou složku. Slouží jako stabilizátor střevní mikrobioty. Cílem tohoto výzkumu bylo ověřit vliv *Clostridium butyricum* na střevní mikrobiotu a mikrobiotu volete a na užitkovost brojlerů a na střevní mikrobiotu selat. Hypotézou bylo, že zvířata v pokusné skupině budou mít vyšší přírůstky a stabilní střevní mikrobiotu. Po většinu pokusu byly zjištěny statisticky významně vyšší ($P < 0,05$) průměrné hmotnosti brojlerových kuřat krmených 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 u selat. Selata v pokusné skupině vykazovala významně nižší ($P < 0,05$) počty *Escherichia coli* ve slepém střevě. Výsledky naznačují schopnost probiotického kmene *Clostridium butyricum* příznivě ovlivnit střevní mikrobiotu a užitkovost hospodářských zvířat.

Klíčová slova: Miya-Gold, Escherichia coli, brojlerové kuře, sele

ÚVOD

Střevní mikrobiota je důležitým faktorem, který ovlivňuje zdraví každého jedince tím, že chrání jeho tělo před různými nemocemi (Guarner et Malagelada, 2003), přeměňuje nestravitelné sacharidy na těkavé mastné kyseliny, syntetizuje některé vitaminy a metabolizuje některé cizorodé látky (Cummings et MacFarlane, 1997).

Ve velkochovech je rozvoj střevní mikrobioty zvířat často ovlivněn podmínkami chovu - například hygienou, medikací, podmínkami v líhni, líhnutím i odchovem. V důsledku toho mohou být kuřata náchylnější ke kolonizaci patogenními bakteriemi (Barrow 1992). Vzhledem k těmto okolnostem bylo běžnou praxí užití antibiotik jako prevence výskytu chorob. V roce 2001 Evropská komise zakázala užití antibiotik k preventivním účelům (European Commission 2001). V důsledku toho vzrostl zájem o užití alternativních léčivých produktů, které by chránily kuřata před nemocemi. Jednou z možností ochrany je užití probiotik.

Podle nejaktuálnější definice od Hilla et al. (2014) jsou probiotika živé mikroorganismy, které, jsou-li podány v adekvátním množství, prospívají hostitelovu zdraví. Mnoho různých druhů bakterií je dnes považováno za probiotické, nejčastěji jsou to bifidobakterie a laktobacily, méně často jsou jako probiotické označovány i některé kmeny kvasinek, *Escherichia coli* a klostridií. Právě na klostridie se zaměřuje naše práce, ve které testujeme probiotické vlastnosti kmene *Clostridium butyricum* (FERM BP-2789), který je obsažen v preparátu Miya-Gold S, jako účinná látka.

Miya-Gold S je zootechnické aditivum pro výkrm kuřecích brojlerů. Obsahuje 5×10^8 KTJ/g životaschopných spor *Clostridium butyricum*. Produkt je schválen v EU pro výkrm brojlerových kuřat a menšinových druhů ptactva s výjimkou nosnic, odchov krůt a pro odstavená selata (Evropská komise, 2011; Evropská komise, 2014). Miya-Gold je rovněž schválen v mnoha

asijských zemích pro lidskou výživu a jako krmné aditivum pro většinu druhů ptactva. Obsažené *Clostridium butyricum* pochází původně z půdy, předpokládá se jeho schopnost zlepšit konverzi krmiva, denní přírůstky, a tím i porážkovou hmotnost u krmených zvířat (European Food Safety Authority, 2011).
Cílem této práce bylo posoudit vliv Miya-Goldu na konverzi krmiva, denní přírůstky, porážkovou hmotnost a střevní mikrobiotu kuřecích brojlerů a rovněž na střevní mikrobiotu selat po odstavu.

METODIKA

Pokus na kuřatech: Bylo testováno celkem 160 kuřecích brojlerů ROSS 308, kterým bylo podáváno po celou dobu výkrmu, tj. od 2. do 49. dne krmivo na bázi BR-2. Pokusná skupina dostávala navíc s tímto krmivem MiyaGold S v dávce 1 kg/1 t krmiva. Krmivo bylo peletováno za účelem snížení prašnosti. Obě skupiny zahrnovaly 80 jedinců.

Ve výživářské části byly sledovány průměrná hmotnost, konverze krmiva a průměrné denní přírůstky po celou dobu pokusu. V mikrobiologické části byly odebrány vzorky ze slepého střeva a z volete vždy pěti jedinců z každé skupiny ve dnech 1, 10 a 42 a byly sledovány celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterií, laktobacilů, enterokoků a *Escherichia coli*. Tráveniny byly asepticky odebrány v množství okolo 1 g a ihned vloženy do zkumavky se sterilním médiem a s řízenou, kyslíku prostou atmosférou pro uchování anaerobních bakterií. Ihned po odběru proběhlo kultivační stanovení mikroorganismů plotnovou metodou za použití živných médií (Oxoid Ltd., Wade Road, Basingstoke, Hampshire, Spojené království) z Tab. 1.

Testované bakterie	Kultivační médium a podmínky kultivace
Celkové počty anaerobů	Wilkins-Chalgren anaerobe agar s přídavkem Sójového peptonu (W+S); 37 °C, 48 h, anaerobně
Bifidobakterie	W+S s přídavkem mupirocinu mupirocin and kyseliny octové podle Rady et Petra (2000); 37 °C, 48 h, anaerobně
Laktobacily	Rogosa agar; 37 °C, 48 h, mikroaerofilně
Enterokoky	Slanetz-Bartley agar; 37 °C, 48 h, aerobně
Escherichia coli	T.B.X. agar; 37 °C, 24 h, aerobně

Tab. 1: Živná media použitá pro kultivaci

Dále byla ve vzorcích ze slepých střev provedena za pomocí plynové chromatografie analýza těkavých mastných kyselin za použití Stabilwax®-DA kolony a vodíku, jako mobilní fáze.

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%, 1,5 kg/t krmiva), ve které byl jedincům podáván butyrát a pokusná, ve které byl jedincům podáván Miya-Gold S (0,5 kg/t 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 kuřecích brojlerů.

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 A DISKUSE

Pokus na brojlerových kuřatech: Naměřené hodnoty průměrné hmotnosti, denních přírůstků a konverze krmiva naleznete v tabulkách 2, 3 a 4.

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

Tabulka 2: Průměrné hmotnosti testovaných brojlerů. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a pokusnou skupinou (P < 0.05) jsou vyjádřeny hvězdičkou (*).

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

Tabulka 3: Průměrné denní přírůstky testovaných brojlerů.

Konverze krmiva (kg)							
Den / **Skupina**	1 - 7	1 - 10	11 - 20	21 - 35	36 - 49	Do 35	Do 49
Kontrolní skupina	2.09	1.90	1.81	1.82	2.76	1.90	2.08
Pokusná skupina	1.53	1.71	1.70	2.22	2.04	1.79	1.84

Tabulka 4: Konverze krmiva testovaných brojlerů.

Výsledky naznačují schopnost Miya-Goldu zvýšit konverzi krmiva a přírůstky, a tím i porážkovou hmotnost testovaných brojlerů. Jedinou výjimkou byl 35. den, kdy došlo k vyrovnání průměrných hmotností. Teoreticky mohlo být příčinou hierarchické chování zvířat ve skupině, kdy silnější jedinci začali zabraňovat přístupu ke krmení ostatním a čímž se podstatně zvýšila nevyrovnanost souboru (Estevez et al., 2003).

Výsledky analýzy mikrobioty jsou v tabulkách 5 a 6. Hodnoty jsou v log KTJ/g. Výsledky analýzy TMK jsou uvedeny v tabulce 7, hodnoty jsou v mMol/L.

Cékum	**Den 1**		**Den 10**		**Den 42**	
Skupina	**Kontrola**	**Miya-Gold**	**Kontrola**	**Miya-Gold**	**Kontrola**	**Miya-Gold**
Celkové počty	10.08 ± 0.26	10.06 ± 0.28	10.09 ± 0.20	10.25 ± 0.32	10.09 ± 0.26	10.13 ± 0.23
Bifidobakterie	4.92 ± 1.27	5.09 ± 1.09	9.18 ± 0.23	8.83 ± 1.35	9.92 ± 0.36	9.55 ± 0.19
Laktobacily	5.91 ± 0.47	6.87 ± 0.91	9.04 ± 0.19	8.55 ± 0.56	8.53 ± 0.31	9.01 ± 0.40
Enterokoky	9.55 ± 0.43	8.90 ± 1.75	8.64 ± 0.35	7.82 ± 0.61	**8.10 ± 0.17***	**7.55 ± 0.39***
E. coli	9.60 ± 0.06	9.03 ± 1.70	**8.47 ± 0.81***	**7.29 ± 0.61***	**8.22 ± 0.64***	**7.00 ± 0.92***
pH	NT	NT	**5.16 ± 0.15***	**5.70 ± 0.43***	6.44 ± 0.09	6.04 ± 0.51

Tabulka 5: 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	
Skupina	**Kontrola**	**Miya-Gold**	**Kontrola**	**Miya-Gold**	**Kontrola**	**Miya-Gold**
Celkové počty	8.95 ± 0.31	9.01 ± 0.12	9.32 ± 0.39	9.58 ± 0.46	8.74 ± 0.56	9.65 ± 0.33
Bifidobakterie	ND	5.40 ± 0.46	**5.04 ± 0.39***	**4.29 ± 0.55***	5.20 ± 0.32	4.73 ± 0.96
Laktobacily	5.54 ± 1.72	7.29 ± 0.78	8.82 ± 0.11	8.69 ± 0.63	8.29 ± 0.59	9.04 ± 0.44
Enterokoky	7.73 ± 0.78	7.84 ± 0.28	8.08 ± 0.33	8.34 ± 0.63	7.18 ± 0.43	6.94 ± 0.40
E. coli	7.90 ± 0.78	7.96 ± 0.75	ND	ND	**6.73 ± 0.52***	**5.64 ± 0.47***
pH	NT	NT	4.72 ± 0.11	4.42 ± 0.22	**5.74 ± 0.53***	**4.72 ± 0.35***

Tabulka 6: Analýza mikrobioty volete. Statisticky významné rozdíly (P < 0.05) jsou znázorněny hvězdičkou (*). NT = netestováno, ND = pod hranicí detekce.

Den 42	Cékum		Vole	
TMK	**Kontrola**	**Miya-Gold**	**Kontrola**	**Miya-Gold**
Acetát	441.52 ± 32.86	381.08 ± 63.11	59.42 ± 35.15	58.79 ± 29.03
Propionát	183.42 ± 41.20	196.96 ± 57.42	1.14 ± 2.20	0.27 ± 0.38
Isobutyrát	3.37 ± 0.68	2.14 ± 1.23	2.19 ± 2.85	1.85 ± 1.52
Butyrát	**103.41 ± 14.78***	**132.12 ± 18.51***	ND	ND
Isovalerát	7.51 ± 2.43	4.08 ± 3.46	0.48 ± 0.62	ND
valerát	8.24 ± 2.33	4.80 ± 3.46	2.46 ± 3.71	1.25 ± 1.32
Isokapronát	**0.91 ± 0.56***	**2.74 ± 1.63***	4.64 ± 7.37	3.70 ± 4.45
Kapronát	1.18 ± 2.63	0.28 ± 0.40	0.84 ± 0.91	2.78 ± 3.54
Heptanoát	ND	ND	ND	ND
∑	749.57 ± 59.11	724.19 ± 96.92	71.16 ± 28.36	68.63 ± 25.95

Tabulka 7: Analýza těkavých mastných kyselin v céku a voleti v den 42. Statisticky významné rozdíly (P < 0.05) jsou znázorněny hvězdičkou (*). ND = pod hranicí detekce.

Pokus na selatech:

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

Tabulka 8: Analýza mikrobioty céka a jejuna u testovaných selat 17 dní po začátku pokusu. Statisticky významné rozdíly (P < 0.05) jsou znázorněny odlišným písmenem (a, b). ND = pod hranicí detekce.

Den 17	Cékum									
Kyselina →	**Octová**	**Propionová**	**Isomáslená**	**Máselná**	**Isovalerová**	**Valerová**	**Isohexanová**	**Hexanová**	**Heptanová**	**∑**
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	**0,31±0,07 b**	**0,56±0,53 b**	**0,77±0,17 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	**0,00±0,00 a**	**0,04±0,07 a**	**0,02±0,05 a**	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	**0,00±0,00 a**	**0,22±0,48 ab**	**0,04±0,10 a**	321,87±122,98
↑Skupina↓	**Jejunum**									
Kontrola	28,61±10,22	0,04±0,08	**0,60±0,14 b**	0,00±0,00	**0,34±0,07 b**	0,01±0,02	**0,41±0,10 b**	**0,34±0,05 b**	**3,80±1,83 b**	34,14±11,95
Butyrát	42,31±19,82	1,28±1,93	**0,02±0,04 a**	0,20±0,53	**0,00±0,00 a**	0,00±0,00	**0,00±0,00 a**	**0,00±0,00 a**	**2,56±2,62 ab**	46,37±22,23
Miya-Gold	35,41±31,18	0,52±0,41	**0,11±0,21 a**	5,35±10,95	**0,22±0,45 ab**	0,00±0,00	**0,00±0,00 a**	**0,00±0,00 a**	**1,02±1,20 a**	42,62±41,53

Tabulka 9: Analýza těkavých mastných kyselin v céku a jejunu selat 17 dní po začátku pokusu. Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) jsou znázorněny odlišným písmenem (a, b).

Statistické šetření nalezlo 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.

Brojlerová kuřata krmená Miya-Goldem vykázala statisticky významně nižší počty *E.coli* v céku i voleti ke dni 42. Dále byl v céku pokusné skupiny významně vyšší obsah kyseliny máselné, což se dá vysvětlit přítomností a metabolickou aktivitou dodaného probiotického *Clostridium butyricum.* Podobných výsledků bylo dosaženo i u selat. Selata, která přijímala v krmivu Miya-Gold měla v céku statisticky významně nižší počty *E.coli*, na rozdíl od skupiny, která přijímala butyrát. Tato data naznačují, že význam Miya-Goldu spočívá nejen v produkci kyseliny máselné, ale i v přítomnosti samotného *Clostridium butyricum*. Výsledky ukazují schopnost Miya-Goldu ovlivnit složení střevní mikrobioty i mikrobioty volete. 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). Kyselina máselná je také zdrojem energie pro buňky střevního epitelu, její význam tak lze ve střevě hodnotit jako veskrze pozitivní.

ZÁVĚR

Naše výsledky prokazují schopnost testovaného kmene *Clostridium butyricum* ve formě krmného aditiva Miya-Gold S pozitivně ovlivnit mikrobiotu kuřecího céka a volete a rovněž i céka selat a tím potenciálně riziko vzniku infekčních onemocnění během chovu. Zároveň jsme vysledovali vyšší přírůstky u pokusných brojlerových kuřat. Význam Miya-Goldu tedy spočívá jak v úpravě střevní mikrobioty, tak i v podpoře užitkovosti. Je tudíž potenciálním probiotikem.

PODĚKOVÁNÍ

Tento výzkum byl proveden s podporou projektu č. 14-31984P Grantové agentury ČR a s podporou společnosti Huvepharma NV Belgium.

SEZNAM LITERATURY

Barrow, P. (1992) Probiotics for chickens. In Fuller R (ed.): Probiotics, The Scientific Basis. Springer, London, United Kingdom, 225-257.

Cummings J.H., MacFarlane G.T. (1997): Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. Clinical nutrition, 16(1), 3-11.

Estevez I., Keeling L.J., Newberry R.C. (2003): Decreasing aggression with increasing group size in young domestic fowl. Applied Animal Behaviour Science, 84(3), 213-218.

Evropská komise (2001): Commission Regulation (EC) No 2205/2001 concerning additives in feedingstuffs as regards withdrawal of the authorisation of certain additives. Brussels, Belgium. Dostupné z: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32001R2205&from=EN

Evropská komise (2011): PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 373/2011 ze dne 15. dubna 2011 o povolení přípravku Clostridium butyricum FERM-BP 2789 jako doplňkové látky pro menšinové druhy ptactva, s výjimkou nosnic, odstavená selata a menšinové druhy

prasat (odstavených) a o změně nařízení (ES) č. 903/2009 (držitel povolení Miyarisan Pharmaceutical Co. Ltd., zastoupený společností Miyarisan Pharmaceutical Europe S.L.U.). Dostupné z: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?qid=1473935473015&uri=CELEX:32011R0373

Evropská komise (2014): PROVÁDĚCÍ NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1108/2014ze dne 20. října 2014 o povolení přípravku Clostridium butyricum (FERM BP -2789) jako doplňkové látky pro výkrm krůt a odchov krůt (držitel povolení Miyarisan Pharmaceutical Co.Ltd., zastoupený společností Miyarisan Pharmaceutical Europe S.L.U.). Dostupné z: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32014R1108

European Food Safety Authority, (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, 9(1), 1951.

Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E., (2014): Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 11(8), 506-514.

Guarner F., Malagelada J.R. (2003): Gut flora in health and disease. The Lancet, 361(9356), 512-519.

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

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

HODNOCENÍ KRMIV METODOU POSUZOVÁNÍ ŽIVOTNÍHO CYKLU (TZV. LCA-LIFE CYCLE ASSESSMENT)

[1]prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc., [1]prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc., [1]Ing. Pavel Horký, Ph.D., [1]Ing. Hana Dočkalová, [2]Dr. Ing. Pavel Tvrzník

[1] Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Zemědělská 1, 613 00 Brno
[2] MIKROP ČEBÍN a.s., Čebín 416, 664 23

Posuzování vlivu výroby potravin na životní prostředí je dnes věnována poměrně velká pozornost. Jednotlivé země, které se zavazují podpisy svých státníků pod tzv. „protokoly“ (Kjótský, Pařížský, aj.), na sebe berou odpovědnost, že svými vnitřními rozhodnutími omezí vznik „skleníkového efektu“ či „skleníkových plynů“ na svém území. Většinou toto politické rozhodnutí způsobuje na domácí scéně mnoho problémů. Historicky se na tvorbě „skleníkových plynů“ podílela výroba především na severní polokouli (USA, VB, Německo, Francie, Itálie, aj. země). Vyspělé ekonomiky za svoji výrobu „skleníkových plynů“ neplatily nic a dnes chtějí po rozvíjejících ekonomikách, aby svoji výrobu omezily a zdražily opatřeními na pokles tvorby těchto plynů. To se samozřejmě nemůže obejít bez problémů. V loňském roce jsme například v Číně v denním tisku zaznamenali velkou diskusi o tom, zda se má Čína zavázat podpisem „Pařížského protokolu“ k finančním závazkům ve výši přibližně 80x přesahující český rozpočet po roce 2025 anebo v konečném důsledku to údajně povede ke zdražení potravin až 3,5x. Právě argumenty o zdražení potravin v důsledku omezení tvorby „skleníkových plynů“ jsou příčinou toho, že mnoho vědců se zamýšlí nad tím, jak a která část výroby potravin přispívá k produkci „skleníkových plynů“. Bohužel seriózně se tato oblast nezkoumá a často se argumentuje spíše „přáními“ než „vědeckými“ argumenty.
Pojem „skleníkový efekt“ se používá v běžné řeči k označení dvou rozdílných věcí:

a) Přírodní skleníkový efekt
b) Antropogenní skleníkový efekt

Přírodní skleníkový efekt - je to skleníkový efekt vyskytující se přirozeně na Zemi téměř od samotného počátku jejího vzniku. Je mylné vnímat jej jako škodlivý, neboť bez výskytu přirozených skleníkových plynů by průměrná teplota při povrchu Země (určovaná jen radiační bilancí) byla -18 °C. Účinek přirozeného skleníkového efektu se tak stal nezbytným předpokladem života na Zemi. Země zachycuje ohromné množství slunečního záření. Tato hodnota výrazně převyšuje energetický výkon lidských aktivit - je zhruba 12 000x větší, než současná energetická spotřeba lidstva.
Vodní páry způsobují asi 60 % zemského přirozeného skleníkového efektu. Ostatní plyny ovlivňující tento efekt jsou oxid uhličitý (kolem 26 %), methan, oxid dusný a ozón (asi 8 %). Souhrnně tyto plyny nazýváme **skleníkovými plyny**.
Vlnové délky světla absorbovaného plyny lze určit pomocí kvantové mechaniky podle vlastností molekul různých plynů. Odlišné vlastnosti molekul různých plynů jsou důvodem, proč **vodní páry** a **oxid uhličitý** jsou skleníkovými plyny, zatímco hlavní složky atmosféry (molekuly kyslíku a dusíku) ne.
Pojem skleníkový efekt použil jako první francouzský vědec Fourier. Pochází od skleníků užívaných v zahradnictví, nejedná se však o příliš přesné pojmenování, neboť skleníky pracují na jiném principu: skleník je vybudován ze skla; ohřívá se přímo, neboť Slunce ohřívá zemi okolo něj, od ní se ohřívá vzduch nad ní a sklo brání ohřátému vzduchu stoupat a uniknout pryč.

Antropogenní skleníkový efekt - jeho původ tkví v lidské činnosti (nejčastěji spalování fosilních paliv, kácení lesů a globální změny krajiny, …) a který velmi pravděpodobně způsobuje globální oteplování. Míra významu druhého jevu je předmětem sporů (zdroje: http://www.wikipedia.cz http://www.meteocentrum.cz http://www.priroda.cz).

Koncem minulého tisíciletí se tento antropogenní skleníkový efekt začal počítat jako tzv. uhlíková stopa (carbon footprint). Mnohé tzv. ekologické (ale i vyrábějící elektrickou energii – např. ČEZ) organizace na své weby umístily kalkulačky uhlíkové stopy. Z počátečních výsledků se ukázalo, že za produkci antropogenních skleníkových efektů může výroba energie, přeprava, průmyslová výroba aj. Nesprávná argumentace o tom, kdo za oteplování země může, zpočátku zemědělskou výrobu označovala za tzv. „zelenou“ cestu, ale koncem 90.let právě výroba potravin začala být označována za velmi silný zdroj skleníkových efektů. Začátkem 90.let minulého století jsme se domnívali, že zemědělská výroba se podílí na tvorbě skleníkových plynů asi z 34 %. Obzvláště živočišná výroba se stala trnem v oku různým “ekologickým“ aktivistům i v České republice. Při výpočtech také vycházelo konvenční zemědělství jako významný zdroj skleníkových plynů a tzv. „ekologické“ zemědělství jako oblast výroby potravin, která vůbec nezatěžuje naši planetu. Při podrobnějších výpočtech, kdy se výsledek počítal na produkci „poživatelných potravin“ (podle bývalého redaktora časopisu Feedstuffs pana Johna Gadda) se odhalil tento nesprávný předpoklad. Dalším takovým chybným předpokladem byla výroba potravin v konkrétní zemi. Jako příklad uvedeme výrobu potravin ve Velké Británii. Výpočty naznačily, že výroba živočišných produktů na britských ostrovech zatěžuje přírodu skleníkovými plyny mnohem méně než v USA. Úvaha vycházela z toho, že v Británii se zemědělsky vyrábí jen 2/3 krmiv (zatěžující uhlíkovou stopou při výrobě masa, mléka, vajec, aj.) a poslední třetina krmiv se vyrábí mimo teritorium VB (tedy nezatěžuje uhlíkovou stopou produkci potravin). Potom se při dalším hodnocení uhlíkové stopy vycházelo z toho, že výroba potravin na ostrovech je mnohem ekologičtější než v jiných zemích.

Hodnocení krmiv

Evropská unie se postupně snaží vnést legislativní pořádek do celé problematiky. V italské Parmě (sídlo EFSA) se před časem rozhodlo zavést jednotný katalog krmiv a definice katalogu prošla zatím dvakrát revizí (2011 a 2013). V hodnocení krmiv se zatím definují systémy analýz, tak aby byl jednotný pohled na krmiva ve všech zemích. V této oblasti je asi největším problémem hodnocení obsahu efektivně zvířaty využitelné energie. Hodnocení podle spalného tepla je sice nejpřesnější, ale asi je třeba se více přiblížit v tomto hodnocení na úroveň zvířat, pro které je toto hodnocení určeno a hodnotit obsah zdánlivě i skutečně stravitelné energie, metabolizovatelné energie anebo netto energie. Také problematika hodnocení dusíkaté složky je velmi komplikovaná a definovat dnes pouze hrubý protein (dříve značeno jako dusíkaté látky anebo obsah dusíku násobeného koeficientem 6,25) je z krmivářského pohledu nedostatečné a měla by se tato složka hodnotit v pojmech "metabolizovatelný protein", skutečně stravitelné aminokyseliny (například skutečně stravitený lyzin, skutečně stravitelný methionin, aj.). Bohužel nelze mluvit jen o skutečně stravitelné aminokyselině, ale musí být definováno pro jaký druh (případně kategorii) zvířat tento pojem je určen (skutečně stravitelný threonin pro prasata (ss_thr_p) nebo skutečně stravitelný methionin pro drůbež (ss_met_d), aj.).

Ještě před koncem minulého tisíciletí přišla v Holandsku a Německu skupina odborníků s návrhem na posuzování krmiv podle produkce skleníkových plynů a navrhla jednotku „oxid uhličitý ekvivalent“. Tento návrh měl popsat, jak asi je náročná výroba masa, mléka či vajec v zatěžování životního prostředí skleníkovými plyny (především CO_2, plyny obsahující N anebo síru). Byl navržen postup jak přepočítávat plyny obsahující dusík anebo síru na tzv. „oxid uhličitý ekvivalent“. Smyslem tohoto postupu bylo vnést pořádek do neustálého osočování tzv. „konvenčních“ zemědělců, že znečišťují skleníkovými plyny životní prostředí více než tzv. „eko“, „bio“ anebo „organic“ zemědělci. Jednotka „**oxid uhličitý ekvivalent**“ jednoznačně

prokázala, že sice „konvenční“ zemědělci produkují více skleníkových plynů, ale při přepočtu jejich produkce na poživatelné potraviny (maso, mléko, vejce, aj.) je jejich produkce vzhledem k životnímu prostředí o 25 až 80 % šetrnější než tzv. „eko“ produkce.

IPPC

Nové (i zásadně rekonstruované) zemědělské nebo potravinářské projekty musí být dnes zpracovány podle zásad EIA (Proces EIA (Environmental Impact Assessment) - posuzování vlivu na životní prostředí). V takovém případě probíhá posuzování vlivů na životní prostředí v rámci procesu SEA (Strategic Environmental Assessment). **Integrovaná prevence a omezování znečištění** (IPPC), upravená zákonem č. 76/2002 Sb., je dalším preventivním nástrojem v oblasti ochrany životního prostředí.
Základním nástrojem IPPC je tzv. integrované povolení a povolovací řízení, směřující k jeho vydání a periodickému obnovování. Integrované povolení nahrazuje několik rozhodnutí, vyjádření a souhlasů příslušných správních orgánů a neobejdou se bez něj například velké energetické, chemické, metalurgické, **potravinářské a zemědělské podniky** a **podniky zabývající se zpracováním a ukládáním odpadů**.

Uhlíková stopa

Protože skleníkových plynů je celá řada, začal se v posledních letech pro jejich produkci používat jednotný přepočítávací faktor: **CO_2eq**, **CO_2ekv** nebo **CO_2e** (oxid uhličitý ekvivalent). **Oxid uhličitý ekvivalent** – je průměr všech klimatických relevantních emisí, které mohou přispívat ke vzniku skleníkových plynů. Pro specificky složený skleníkový plyn se dá odhadnout oxid uhličitý ekvivalent velmi orientačně (IPCC, 2006) v g/kg a nebo v kg/kg produktu podle následujících ekvivalentů:

Tab. Ekvivalent pro přeměnu plynu na standardizovaný oxid uhličitý (Oxid uhličitý ekvivalent)

Jednotka	IPPC (2006)	ČSN 14067 (2015)
CO_2	1	1
CH_4	23	23
N_2O	300	298

Poznámka: sloučeniny uhlíku s chlorem nebo fluorem mají podle ČSN 14067 (2015) velmi vysoké (2000-14000) přepočítací koeficienty na oxid uhličitý ekvivalent

Posuzování životního cyklu (LCA – Life cycle assessment) krmiv

Základním principem této metody je posuzovat produkty v celém cyklu jejich použití. Jako příklad si uvedeme výrobu kukuřičné siláže. Vycházíme z předpokladu, že pole pro setí kukuřice se musí upravit (orba, smykování, aj.), **hnojit** (velké rozdíly mezi jednotlivými zeměmi), pak osít osivem, kultivovat po vzejití, postříkat proti plevelům (velké rozdíly podle místa pěstování). Dalším krokem je **vlastní výnos hmoty** (uhlíku a dusíku) z hektaru, sklizeň, doprava do silážních prostor (žlaby, věže, silážní vaky), udusání, zakrytí, přidání konzervačních prostředků (?), aj. Následuje výběr krmné hmoty (frézování, „vykusování“, doprava krmným vozem, přihrnování krmiva). Vlastní konzum silážní hmoty zvířaty (tvorba metanu a oxidu uhličitého), uložení exkrementů (výkalů, kejdy, moče), přeprava do polních hnojišť, ošetřování polního hnojiště, doprava hnoje (kejdy, močůvky, aj.) do půdy a její zapracování pod povrch půdy tak, aby nedošlo k navýšení úniku skleníkových plynů. Je samozřejmě možné do celého procesu započítat i produkci skleníkových plynů při výrobě přepravních prostředků, při stavbě stájí, při dopravě pracovníků do místa práce, atd. Velká přesnost například zavedení nákladů na výrobu

osiva rodičovských a prarodičovských rostlin by nepřinesla velké zpřesnění. Zdá se, že tyto přesné výpočty jsou v celkovém hodnocení krmiv LCA zanedbatelné a zatím se z výpočtu vypouštějí. Přesnost by vedla k takovým komplikacím, že by se v praxi systém nedal použít. Jako příklad uvádíme tabulku na výrobu sójového oleje (graf 1), kde je nutné při procentickém hodnocení uvažovat s čísly na čtvrtém, pátém či osmém desetinném místě. K tomuto účelu zpracovala skupina kolem dr. H. Blonka na universitě ve Wageningen model a počítačový program, který nabízí jak zemědělcům v Holandsku tak po celém světě. Návody na výpočet nutných operací pro pěstování rostlin (obili) zpracovali do publikace Marinnussen aj. 2012 a pro operace s krmivy Vellinga aj (2013). Při podrobném studiu jejich materiálů se nám zdálo, že je nutné pro české poměry zpracovat podobnou metodickou příručku (hlavní rozdíl v ČR – nehnojíme tolik kg čistých živin na 1 ha, nemáme tolik postřiků na 1 ha a také používáme jiné stroje na sklizeň). Marinussen zpracoval svoje doporučení i pro krmiva pěstovaná (dovážená) do Holandska z jiných částí světa. Také výnosy z 1 ha jsou rozdílné v USA nebo v Německu anebo v afrických zemích.

V metodickém materiálu Vellinga aj. (2013) jsou již zpracovány číselné podklady pro odhad produkce celkových skleníkových plynu (CHG) například po použití monoammoniumfosfátu (4,75 kg na kg N), nebo NPK různého složeni (6,19-19,6 kg na kg užitého N). Velmi důležité je také stanovení, kolik celkových skleníkových plynů se vyprodukuje při spotřebě kilowattu energie. Bohužel tabulky Vellinga aj. (2013) naznačují, že produkce CHG při výrobě energie je rozdílná v západní Evropě tak v Rusku a zemích Centrální Evropy (kam řadí tyto holandské tabulky i naši Českou republiku).
Emisní faktory při užití aditiv mají také stanoveny svoje koeficienty

Tab. Emisní faktory některých aditiv (Vellinga aj. 2013)

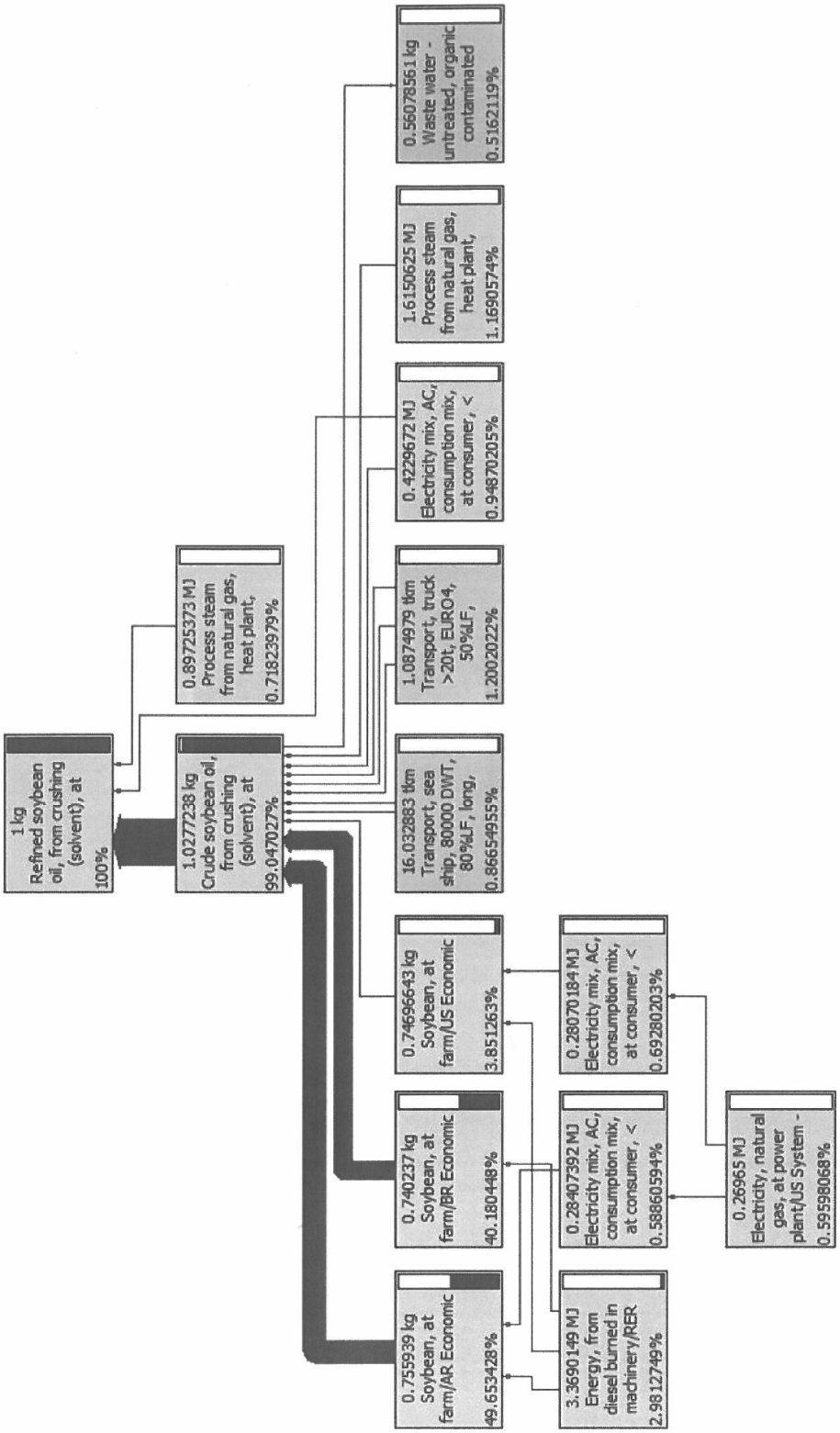
Zdroj / aditivum	gramy CO_2e/kg produktu
Methionin	5 493
Threonin	16 978
Lyzin	6 028
NaCl	18
Močovina	1 626

Podle francouzských zdrojů (Giles Tran a spolupracovníci na feedipedia.com) je vhodný velmi jednoduchý postup výpočtu emisí celkových skleníkových plynů (CHG) například pro kukuřičnou siláž. Vypočte se základní produkce skleníkových plynů pro výrobu kukuřice silážní (základem je jeden kg silážní hmoty přepočtené na sušinu) a ten se koriguje podle typu sečení (nízké nebo vysoké strniště), délka řezanky, použitého nože, aj. Analýza LCA prokázala, že metoda sečení a délka řezanky je z 88 % zodpovědná za navýšení environmetální zátěže a pracovní postup silážování (dusání, zakrývání, aj.) má jen 12% dopad na zvýšení produkce skleníkových plynů. Kukuřičná siláž uložená v silážní jámě poměrně vysokou měrou zatěžuje životní prostředí celkovými skleníkovými plyny (tzv. CHG) a tato zátěž se dá snížit o 5 až 9 % použitím metody silážování do vaků (rukávců). Tento rozdíl je vysvětlitelný především nižší ztrátou sušiny (Bacenetti aj. 2015, cituje www.feedipedia.com)
Obdobné metodické postupy jsou zpracované pro USA (Anonym, 2001), pro Německo (Flachowski, 2009), pro Holandsko (Blonk a Ponsinen, 2009), pro Francii (Tran aj., 2016) a nebo jsme se pokusili o podobné drobné krůčky v této problematice na naší univerzitě (Novotný 2006, Krobot, 2008, Zeman 2007, 2011).

V roce 2015 došlo v ČR k revizi normy ISO 14067:2015 a bohužel její aplikace v praxi je minimální. Důvodem je asi to, že český text se na 60 stranách vyskytuje jen na obálce a vše ostatní je v jazyce anglickém. To asi není dobrý krok k tomu, aby se praktičtí zemědělci touto

problematikou zabývali. Vzhledem k postupu legislativy a jejího uplatnění v praxi budeme muset v naší výzkumné složce se touto problematikou zabývat.

Graf 1 Schéma a výpočet LCA pro výrobu sójového oleje



Závěr

LCA hodnoceni krmiv – poměrně objektivně hodnotí celkové množství skleníkových plynů (CHG), které vzniká při výrobě krmiv v celém cyklu (od prvního zpracování půdy až po poslední zpracování odpadů z výroby (exkrementy, posklizňové zbytky, atd.). Ze všech systémů hodnocení krmiv podle „posuzování životního cyklu – LCA“ má v současné době velkou naději metoda zpracovaná podle univerzity ve Wagenningenu a dr. Blonka. Pro českou republiku však bude třeba určit pravidla, metodické postupy a případně program používající k výpočtu LCA (či CHG) podle parametrů platných pro české zemědělce.

Poděkování:

Ke zpracování textu bylo použito podkladů získaných při řešení týmového projektu IGA (2016) AF MENDELU

Použitá literatura

ČSN P, CEN ISO/TS 14067, 01 0967 Předběžná česká technická norma, Skleníkové plyny – Uhlíková stopa – Požadavky a směrnice pro kvantifikaci a komunikaci. Vydal Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015 (se souhlasem UNMZ vytisknul Ing. Jiri Hrazdil), 68 stran

ANONYM, Environmental Protection Agency. Emissions From Animal Feeding Operations. USA : Office of Air Quality Planning and Standards, 2001. 414 s.

Blonk, H., Ponsionen, T.: Towards a tool for assessing carbon footprints of animal feed. Netherlands: Blonk Milieu Advies B.V., 2009. 72 s.

Česká Republika. O ochraně ovzduší a o změně některých dalších zákonů. In: Zákon o ochraně ovzduší. 2002, 86/2002 Sb., s. 52.

Flachowsky, G.: Carbon Footprints of Animals - Present Stage of Knowledge and Open Questions to Calculate Footprints for Food of Animal Origin. In.: Delacon Performing Nature Symposium 2009, Crete Island, Greece, November 4.-6. 2009, p-138-144

IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories: Agriculture, Forestry and Other Land Use [online]. Geneva : C/O World Meteorological Organization, 2010 [cit. 2010-04-11]. Dostupné z WWW: <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>.

Krobot, R.: Bilance živin u prasat. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno, 2008. 57 s.

Novotný, L.: Koloběh dusíku v životním prostředí - vztah k výživě zvířat. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno, 2006. 46 s.

Zeman, L. et al.: Jak splnit požadavky systému "Cross-compilace" v oblasti výživy a krmení zvířat. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 75 s. ISBN 978-80-7375-124-1.

Zeman, L., et al.: Výživa a krmení hospodářských zvířat. Praha: Profi Press, 2006. 360 s. ISBN 80-86726-17-7.

Zeman, L., Krobot, R., Doležal, P.: Uhlíková stopa (Carbon Footprints) a její vztah ke krmivářství v EU. In. Sborník z konference u příležitosti 60. výročí založení Výzkumného ústavu živočišné výroby, VÝZNAM VÝŽIVY HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT PRO KVALITU A BEZPEČNOST ŽIVOČIŠNÝCH PRODUKTŮ, 20. května 2011, Praha Uhříněves, s.28-35. ISBN 978-80-7403-081-9

Marinussen, M., van Kernebeek, H., Broekmema, R., Groen, E., Kool, A., van Zeist, W. J., Dolman, M. Blonk, H.: LCI data for the calculation tool feedprint for greenhouse gas emissions of feed production and utilization. Cultivation cereal grains. Vyd. Blonk consultants, Wageningen University and Research Centre, November 2012, 50p.

Vellinga, Th.V., Blonk, H., Marinussen M., van Zeist, W,J., de Boer I.J.M., Starmans, D.: Methodology used in feedPrint a tool quantifying greenhouse gas emissions of feed production and utilization, report 674, Vyd. Wageningen UR Livestock Research, P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad, 2013, 108 p.

Název: AKTUÁLNÍ POZNATKY VE VÝŽIVĚ A ZDRAVÍ ZVÍŘAT A BEZPEČNOSTI PRODUKTŮ 2016

Vydal: **Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.**
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhříněves

ISBN 978-80-7403-152-6

Vydáno bez jazykové úpravy.

© Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhříněves