VÚVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.

FUNKČNÍ VZOREK

Synbiotická krmná směs pro selata po odstavu

Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D.
Mgr. Monika Morávková, Ph.D.
Ing. Iveta Kostovová, Ph.D.
MVDr. Kateřina Kavanová
MVDr. Aleš Brychta

6704
2023

Funkční vzorek 6704/2023

Synbiotická krmná směs pro selata po odstavu

Autoři

Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D.

Mgr. Monika Morávková, Ph.D.

Ing. Iveta Kostovová, Ph.D.

MVDr. Kateřina Kavanová

MVDr. Aleš Brychta

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QK1910351) a Ministerstva zemědělství České republiky (RVO0523).

2023

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

ISBN 978-80-7672-046-6

OBSAH

1. Úvod 3
2. Předmět funkčního vzorku 4
3. Vlastní popis funkčního vzorku 5
3.1 Izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení 5
3.2 Fenotypová charakteristika izolátů 5
3.3 Molekulárně biologická charakteristika izolátů 6
3.4 Konstrukce synbiotické směsi 7
3.5 Vliv synbiotické směsi na zdravotní stav selat 8
3.6 Ochrana selat před infekcí enterotoxigenní *E. coli* 10
3.7 Souhrn 12
4. Srovnání „novosti postupů“ 12
5. Uplatnění funkčního vzorku 12
6. Ekonomické aspekty 13
7. Seznam použité související literatury 13
8. Dedikace 15

1. Úvod

Období v průběhu a bezprostředně po odstavu představuje pro selata v chovech jedno z nejrizikovějších období, ve kterém jsou vystaveny řadě stresových faktorů, jako je například odloučení od matky a sourozenců, přechod z mléka na pevnou stravu či jiné ustájení. Tyto změny představují u selat rizikové faktory pro vznik řady onemocnění projevujících se například průjmy, váhovými úbytky, sníženou konverzí krmiva a v extrémním případě i uhynutím [1]. Ve snaze eliminovat tyto projevy vedoucí rovněž k významným ekonomickým ztrátám byla dříve v chovech prasat běžně k profylaxi průjmových onemocnění využívána antibiotika. S rostoucí hrozbou šíření antibiotických rezistencí v bakteriální populaci však bylo plošné používání antibiotik jako růstových stimulátorů nebo pro profylaktické účely v chovech prasat v Evropské unii legislativně zakázáno od roku 2006.

Jednu z možných alternativ, jak nahradit antibiotika v případě průjmových onemocnění selat, představuje používání probiotik. Za probiotika jsou považovány takové mikroorganismy (bakterie či kvasinky), které při podávání v dostatečném množství zlepšují zdravotní stav hostitele. Jedny z nejčastěji používaných baterií s prokazatelným probiotickým účinkem představují bakterie mléčného kvašení (BMK), zejména rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. V literatuře byl opakovaně popsán jejich účinek na zdravotní stav prasat, který zahrnoval pozitivní vliv na stabilitu a složení střevní mikroflóry, omezení kolonizace střeva patogenními mikroorganismy, snížení míry vylučování patogenů, zmírnění klinických příznaků onemocnění či zvýšení imunitní odezvy organismu [2].

Mezi žádoucí vlastnosti probiotických bakterií patří například produkce vybraných metabolitů prospěšných pro stabilitu zdravé střevní mikroflóry nebo tvorba bakteriocinů - termostabilních peptidů s baktericidním či bakteriostatickým účinkem [3]. Výhodnou probiotickou vlastností je rovněž schopnost bakterií enzymaticky rozkládat hůře utilizovatelné oligo- a polysacharidy zejména rostlinného původu, což u hospodářských zvířat může vést k lepší stravitelnosti krmiv [4]. U probiotických kmenů bakterií je rovněž nezbytná schopnost přežít průchod trávicím traktem hostitele, k čemuž přispívá adaptace na nízké pH v žaludku či produkce enzymů hydroláz rozkládajících žlučové soli, a poté adherovat na mukózní vrstvu střevního epitelu hostitele [5, 6, 7].

Podstatným a naprosto nezbytným bodem při výběru a návrhu nových probiotických preparátů je ovšem jejich biologická bezpečnost, například absence genů rezistence k

antibiotikům či faktorů virulence. Při vyhledávání nových kmenů probiotických bakterií je v současné době důraz stále více kladen nejen na charakteristiku samotných kmenů, ale také na vzájemnou kombinaci jejich vlastností ve směsích vedoucí k jejich synergistickému účinku a tím k efektivní ochraně hostitele před infekcí.

Zdrojem pro izolaci probiotických kmenů BMK může být řada matric, kterými jsou obvykle mléko, mléčné výrobky či fermentované potraviny. Kromě těchto materiálů představuje významný potenciál pro získávání nových kmenů bakterií s žádoucími probiotickými vlastnostmi střevní obsah zdravých jedinců, lidí i zvířat. Trávicí trakt divokých prasat pak může být ideálním zdrojem pro vyhledávání probiotických kandidátů, vhodných pro využití v chovech prasat. Divoká prasata žijí v přirozených podmínkách, bez suplementace krmnými aditivy, léčivy, antibiotiky či probiotiky, která jsou používána v chovech domácích prasat, a konzumují různorodou potravu z různých zdrojů. Střevní mikroflóra divokých prasat, zejména mladých jedinců, proto obsahuje ve srovnání s domácími prasaty jiné spektrum mikroorganismů, které mohou přestavovat ideální rezervoár nových probiotických bakterií [8, 9].

V této studii jsme se proto zaměřili na identifikaci a podrobnou charakterizaci izolátů bakterií mléčného kvašení původem ze střeva divokých prasat z hlediska potenciálních probiotických vlastností. Šest vybraných kmenů BMK jsme pak testovali spolu s obohacenou krmnou směsí typu Starter u selat po odstavu v podmínkách experimentální infekce enteropatogenním kmenem *Escherichia coli*.

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku bylo připravit a otestovat synbiotickou krmnou směs tvořenou šesti podrobně charakterizovanými izoláty bakterií mléčného kvašení původem z trávicího traktu divokých prasat a inovovanou krmnou směsí typu Starter u selat po odstavu po infekci enteropatogenním kmenem *E. coli*.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

3.1 Izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení

Šest vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení (BMK) bylo izolováno v rozmezí let 2019 a 2020 ze vzorků obsahu trávicího traktu (tenkého či tlustého střeva) od divokých prasat (Tabulka 1). Vzorky obsahu střev byly po odběru a transportu do laboratoře vysety na De Man-Rogosa-Sharpeho (MRS; Oxoid) agar a inkubovány při 37°C při mikroaerofilních podmínkách. Izoláty byly nejméně třikrát pasážovány a poté identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Finální identifikace izolátů byla provedena pomocí tzv. „average nucleotide identity“ (ANI) založené na bioinformatické analýze sekvence genomu příslušného izolátu a jeho porovnání se sekvencí typového kmene z veřejně přístupné databáze. Kalkulace ANI byla provedena pomocí nástroje FastANI [10].

Kód izolátu	Zdroj	Věk zvířete	Pohlaví	Orgán	Identifikovaný kmen
M477A	divoké prase	8-10 měsíců	samice	tlusté střevo	*Lactobacillus amylovorus*
M494A	divoké prase	8-10 měsíců	samec	tlusté střevo	*Lactobacillus salivarius*
M587A	divoké prase	8-10 měsíců	samice	tlusté střevo	*Lactobacillus paracasei*
M65A	divoké prase	6-7 měsíců	samec	tlusté střevo	*Lactobacillus mucosae*
M624A	divoké prase	3-4 měsíců	samec	tlusté střevo	*Lactobacillus amylovorus*
M51A	divoké prase	6-7 měsíců	samec	tenké střevo	*Pseudoscardovia radai*

Tabulka 1. Kmeny bakterií mléčného kvašení izolované z trávicího traktu divokých prasat, vybrané pro tvorbu synbiotické směsi pro selata po odstavu.

3.2 Fenotypová charakteristika izolátů

U všech šesti izolátů BMK byla ověřena jejich schopnost růstu v tekutém MRS médiu a schopnost tvořit biomasu v laboratorních podmínkách při kultivaci při 37°C.

Pomocí standardních komerčních biochemických testů API® (50 CH, ZYM a RAPID ID 32A, bioMérieux) byla zjišťována schopnost fermentace substrátů a profil aktivních enzymů.

Všechny testované izoláty byly schopny fermentovat široké spektrum jednoduchých cukrů (celulózu, fruktózu, manózu nebo galaktózu), ale také složitější oligo- nebo polysacharidy (škrob, glykogen, celobiózu, rafinózu nebo melibiózu).

Rovněž byla u všech izolátů stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) k vybraným antimikrobiálním látkám (ampicilin, tetracyklin, streptomycin, erythromycin, klindamycin, vankomycin, chloramfenikol, kanamycin, gentamicin, ciprofloxacin) pomocí standardní jamkové mikrodiluční metody (ISO10932:2010). Jako kontroly byly použity kmeny *Lactobacillus plantarum* ATCC14917 a *Lactobacillus paracasei* ATC334. Výsledky byly vyhodnoceny a srovnány se standardními hodnotami MIC pro *Lactobacillus reuteri* [11].

Izolát M624A vykazoval nízkou MIC k chloramfenikolu a tetracyklinu a kmen M65A k chloramfenikolu. U kmene M477A byla zaznamenána osminásobně zvýšená MIC vůči streptomycinu oproti referenčnímu kmeni. U izolátu M494A byla detekována kombinovaná rezistence ke streptomycinu, tetracyklinu, kanamycinu a gentamycinu. Rezistence k antibiotikům je však u rodu *Lactobacillus* izolovaných z trávicího traktu divokých prasat relativně častá a odpovídá běžně se vyskytujícím rezistencím u bakterií původem ze střeva domácích prasat či lidí [12, 13].

Žádný ze šestice testovaných kmenů nevykazoval hemolytickou aktivitu sledovanou pomocí kultivace na krevním agaru s 5% ovčí krve (Oxoid) při 37°C po dobu 72 hodin.

3.3 Molekulárně biologická charakteristika izolátů

Z buněk každého z testovaných izolátů byla purifikována celková genomová DNA (Quick-DNA^{TM} Fecal/Soil Microbe Microprep Kit, Zymo Research) a zpracována do sekvenační DNA knihovny (Nextera Library preparation kit, Illumina). Celogenomové sekvenování bylo provedeno s využitím platfomy NextSeq 500/550 High Output Kit v.2.5 (Illumina). Následná bioinformatická analýza genomů získaných izolátů byla zaměřena na mapování přítomnosti různých genů v souvislosti s probiotickými vlastnostmi. V rámci analýzy sledována přítomnost genů kódujících produkci bakteriocinů (program Bagel4), genů pro glykosidové hydrolázy (programy Prokka, EggNog mapper, dbCAN), genů kódujících hydrolázy žlučových solí (programy Prokka, EggNog mapper) a genů pro rezistence k antibiotikům (program Abricate).

Všech šest testovaných kmenů neslo ve svých genomech geny kódující bakteriocin enterolysin A. V případě kmene M477A a M624A byly navíc zjištěny geny pro bakteriocin helveticin J, u kmene M494A pro salivaricin a u kmene M587A pro carnocin. U všech izolátů byla také v genomu detekována přítomnost genů souvisejících s adhezí na epiteliální buňky střeva hostitele, jako byl například fibronektin vázající protein. Všechny kmeny rovněž ve svých genomech nesly velké množství genů pro enzymy amylázy, sacharázy, celulázy, maltázy, galaktosidázy či glukosidázy potřebné pro štěpení oligo- či polysacharidů. Každý z šesti testovaných izolátů BMK obsahoval ve svém genomu alespoň jednu kopii genu pro enzym cholyglycin hydrolázu nezbytnou pro štěpení žlučových kyselin. V genomu žádného z šestice vybraných kmenů nebyla zjištěna žádná genetická determinanta pro rezistence k antimikrobiálním látkám.

3.4 Konstrukce synbiotické směsi

Na základě podrobných, výše uvedených charakteristik byla navržena synbiotická směs tvořená:

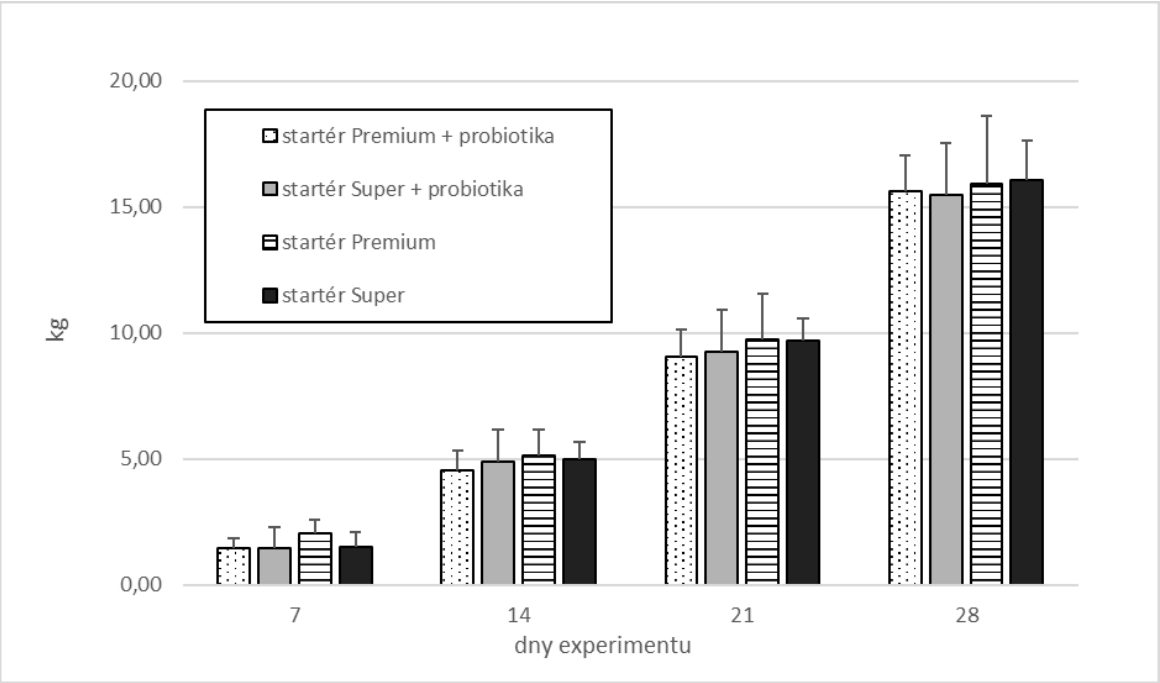
1) Probiotickou kompozicí šesti podrobně charakterizovaných kmenů BMK s definovanými probiotickými vlastnostmi (*Lactobacillus amylovorus* M477A, *Lactobacillus salivarius* M494A, *Lactobacillus paracasei* M587A, *Lactobacillus mucosae* M65A, *Lactobacillus amylovorus* M624A, *Pseudoscardovia radai* M51A)
2) Krmivem typu Starter (Pig Starter Premium) navržené společností Mikrop Čebín, a.s., určené pro selata po odstavu. Toto krmivo bylo oproti kontrolnímu krmivu (viz dále) okyseleno přídavkem organických kyselin (kyselina mléčná, kyselina mravenčí, kyselina fumarová) a obohaceno o butyrát vápenatý, kvasničný extrakt, gluten a řasu *Chlorella vulgaris*, tedy komponenty krmiva, které pozitivně ovlivňují zdravotní stav selat [14, 15].

Jako kontrolní krmivo pro selata v rámci experimentu byl použit Starter nižší kategorie Pig Starter Super (Mikrop Čebín, a.s.) bez výše uvedených aditiv.

3.5 Vliv synbiotické směsi na zdravotní stav selat

Funkčnost sestavené synbiotické směsi byla testována na selatech po odstavu po infekci enteropatogenním kmenem *Escherichia coli*. Během experimentu bylo použito celkem 40 klinicky zdravých selat obou pohlaví po odstavu ve věku 28 dní, která byla rozdělena do čtyř experimentálních skupin po deseti jedincích. Prvních 14 dní trvání experimentu byly dvě pokusné skupiny selat krmeny inovovanou krmnou směsí Pig Starter Premium a dvě kontrolní skupiny selat byly po stejnou dobu adlibitně krmeny krmnou směsí Pig Starter Super. Následných 14 dní pokusu byla selata ve všech čtyřech skupinách adlibitně krmena krmivem typu „časný odstav selat“ (ČOS, Mikrop Čebín, a.s.). Denní dávka krmiva pro jednu pokusnou a jednu kontrolní skupinu zvířat byla obohacena o $1x10^9$ kolonie tvořících jednotek (CFU) testované probiotické kompozice bakterií mléčného kvašení a selatům byla podávána každý den nepřetržitě po celou dobu trvání experimentu (28 dní). Po dobu trvání experimentu byl denně individuálně monitorován klinický stav experimentálních zvířat (zejména výskyt průjmu), tělesná teplota a tělesná hmotnost.

Klinický stav selat, včetně průměrné tělesné teploty, výskytu průjmu či průměrného hmotnostního přírůstku, se v průběhu pokusu zásadně nelišil mezi jednotlivými experimentálními skupinami a nevykazoval souvislost se složením krmiva typu Starter ani s podáváním probiotik bez ohledu na podávané krmivo či suplementaci probiotickými kmeny BMK po celou dobu trvání pokusu (Graf 1).

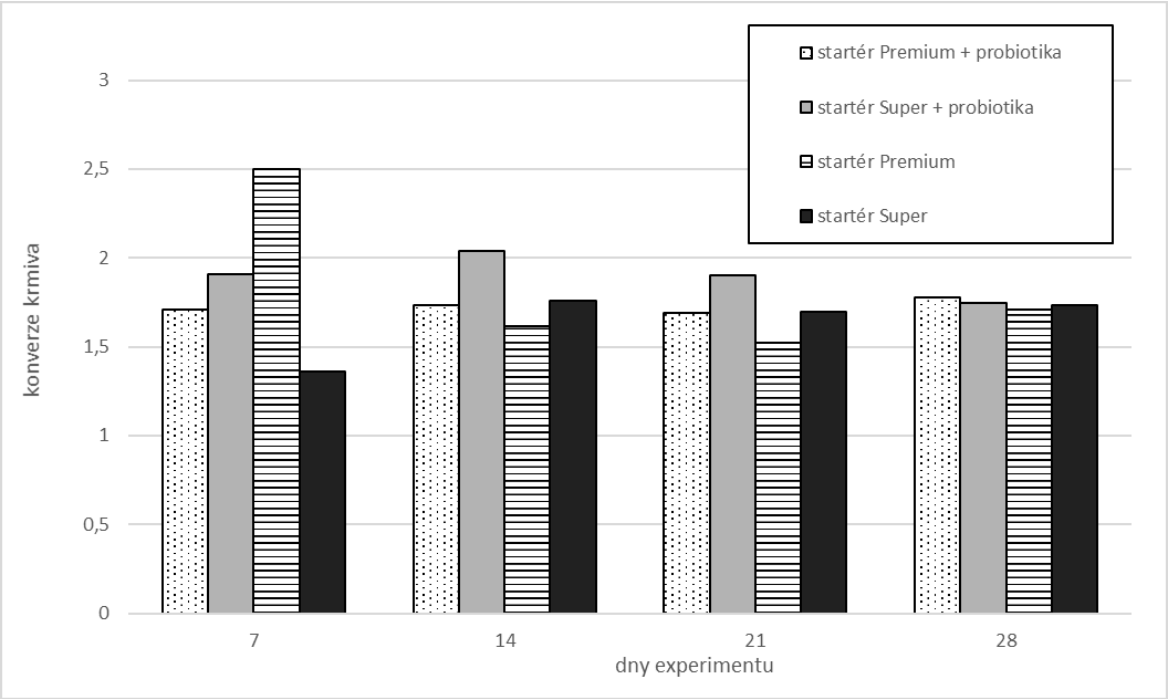


Graf 1. Průměrný hmotnostní přírůstek.

Průměrný hmotnostní přírůstek byl kalkulován pro jednotlivé experimentální skupiny jako rozdíl průměrné hmotnosti selat ve skupině ve dnech 7, 14, 21 a 28 trvání experimentu a průměrné hmotnosti selat v příslušné skupině při zahájení experimentu (den 0).

V průběhu trvání pokusu byla rovněž ve všech skupinách sledována konverze krmiva, která byla vyčíslena jako poměr průměrné hmotnosti krmiva spotřebovaného příslušnou experimentální skupinou k průměrné tělesné hmotnosti selat v dané skupině (Graf 2).

Hodnoty konverze krmiva se v prvním týdnu experimentu mezi skupinami významně lišily bez ohledu na podávaný typ startéru či suplementaci probiotickými kmeny. Rozdíly hodnot konverze krmiva mezi skupinami byly sedmý den pokusu ovlivněny pravděpodobně spíše akutně probíhající infekcí, po jejímž odeznění ve dnech 14 a 21 trvání experimentu byla zaznamenána efektivnější konverze krmiva v pokusných skupinách selat, kterým byla podávána krmná směs Pig Starter Premium bez ohledu na přídavek probiotik. Míra konverze krmiva se 28. den experimentu ustálila na hodnotách srovnatelných pro všechny experimentální skupiny a z dlouhodobějšího hlediska pak v této věkové kategorii selat zřejmě podávání probiotik ani typ startéru nemá na váhové přírůstky ani konverzi krmiva vliv.



Graf 2. Konverze krmiva.

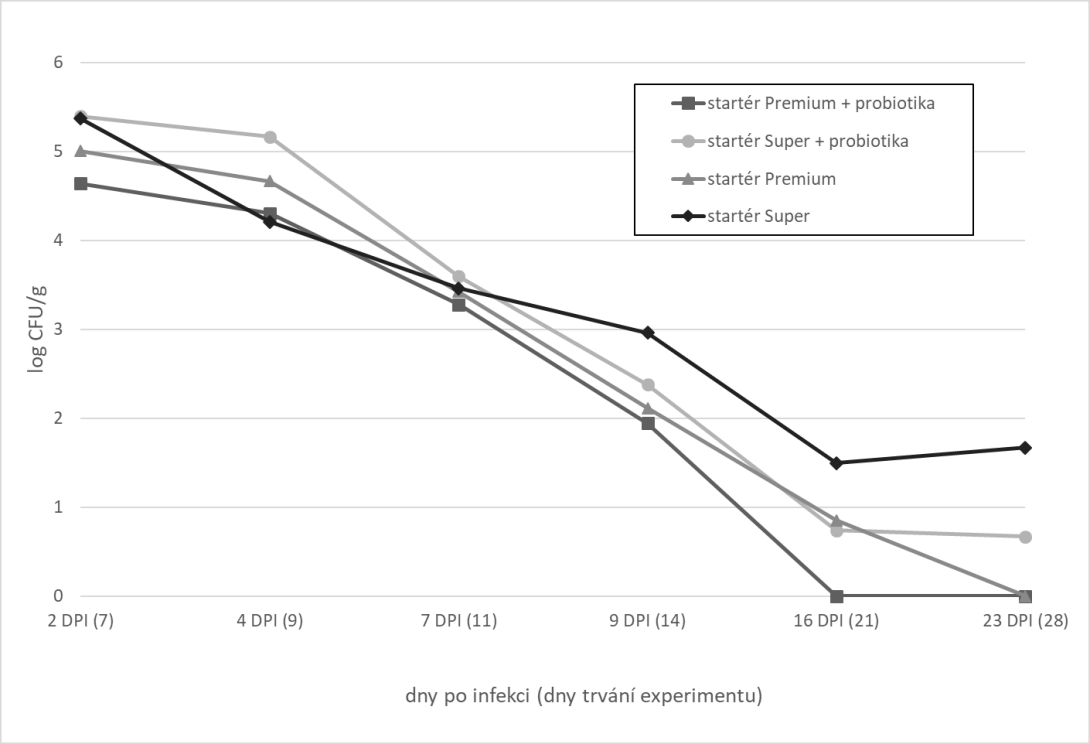
Konverze krmiva byla vyčíslena jako poměr průměrné hmotnosti krmiva zkrmeného v příslušné experimentální skupině k průměrné tělesné hmotnosti všech zvířat dané skupiny v den 7, 14, 21 a 28 trvání experimentu.

3.6 Ochrana selat před infekcí enterotoxigenní *E. coli*

Pátý den trvání experimentu byla všechna selata perorálně infikována suspenzí enterotoxigenního kmene *Escherichia coli* (ETEC) v dávce $1x10^9$ CFU. Pro infekci byl použit klinický virulentní izolát ETEC 3199, produkující enterotoxiny (STb a LT toxiny) a adhezin (F4), přirozeně rezistentní ke kyselině nalidixové. V průběhu experimentu byly pravidelně všem selatům odebrány vzorky trusu pro stanovení míry vylučování ETEC rezistentní na kyselinu nalidixovou v souvislosti s podávaným krmivem a probiotickou kompozicí. Všechny vzorky trusu byly po zvážení, homogenizaci a desetinásobném ředění vysety na MacConkeyův agar (Oxoid) s přídavkem kyseliny nalidixové (25 µg/ml) a po 24hodinové kultivaci v 37°C byl stanoven počet kolonií ETEC.

Míra vylučování ETEC trusem po experimentální infekci selat po odstavu byla v průběhu experimentu ovlivněna typem podávaného startéru. Obě experimentální skupiny

selat, které byly v průběhu prvních 14 dnů po odstavu krmeny inovovaným krmivem Pig Starter Premium, vykazovaly druhý den po infekci nižší hodnoty logaritmů počtů ETEC v trusu než skupiny krmené kontrolním startérem, a to až o jeden řád. V průběhu experimentu počty ETEC vylučované trusem u obou skupin, kterým byl podáván Pig Starter Premium, lineárně klesaly. Přídavek probiotických bakterií ke krmivu typu Pig Starter Premium pak vedl k nejnižším hodnotám logaritmů počtů ETEC vylučované trusem po celou dobu trvání experimentu, ale také k rychlejší eliminaci ETEC z organismu, která byla u této skupiny selat zaznamenána již 16. den po infekci, na rozdíl od všech ostatních tří pokusných skupin.



Graf 3. Vylučování E. coli trusem

V grafu je uvedena hodnota logaritmu počtů E. coli rezistentní na kyselinu nalidixovou na gram trusu pro jednotlivé experimentální skupiny.

DPI – den po infekci, v závorce je uveden den trvání experimentu.

3.7 Souhrn

Synbiotická krmná směs určená pro selata tvořená šesti podrobně charakterizovanými kmeny bakterií mléčného kvašení původem z trávicího traktu divokých prasat v kombinaci s inovovaným krmivem typu Starter je schopna snižovat míru infekce enteropatogenní *Escherichia coli* u selat po odstavu a zkracuje dobu vylučování ETEC trusem, aniž by vykazovala negativní vliv na klinický stav zvířat a jejich užitkovost.

4. Srovnání „novosti postupů“

Standartní, komerčně dostupná probiotika či probiotické směsi jsou konstruovány obvykle s využitím sbírkových kmenů bakterií mléčného kvašení. U těchto kmenů je sice testována jejich bezpečnost ve smyslu absence rezistencí k antibiotikům, ale obvykle postrádají hlubší analýzu probiotických vlastností a není brán v potaz zdroj jejich izolace a schopnost jejich adaptace na hostitele. Rovněž se v chovech hospodářských zvířat užívají komerčně dostupné preparáty empiricky založené na principu kompetitivní exkluze, u kterých ovšem není definována ani zaručena přesná skladba bakteriálního společenstva.

Naproti tomu, směs kmenů bakterií mléčného kvašení původem z trávicího traktu divokých prasat s přesně definovanými probiotickými vlastnostmi, navržená tak, aby se vlastnosti jednotlivých zástupců ve směsi potencovaly, může představovat významný potenciál ve vývoji nových probiotik určených pro selata po odstavu, zejména v kombinaci s vhodně suplementovaným krmivem.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Synbiotická krmná směs byla v rámci experimentu vyvíjena a testována ve spolupráci s firmou Mikrop Čebín, a.s., která se dlouhodobě zabývá vývojem a prodejem krmiv a krmných doplňků pro hospodářská zvířata. Momentálně probíhá studie ověřující stabilitu probiotické směsi v lyofilizovaném stavu a možnosti technologického zpracování této směsi, které by mohlo vést ke komerční produkci probiotického produktu určeného pro selata po odstavu.

6. Ekonomické aspekty

Synbiotická krmná směs tvořená šesti definovanými kmeny bakterií původem z trávicího traktu divokých prasat a inovovaným krmivem typu Starter byla úspěšně otestována ve smyslu ochraně selat po odstavu před infekcí enteropatogenním kmenem *Escherichia coli*. Takto navržená synbiotická krmná směs snižovala počty vylučované *E. coli* po cílené infekci a také zkracovala čas vylučování patogena z organismu. Podávání směsi nemělo vliv na klinický stav zvířat ani parametry užitkovosti.

Vzhledem k tomu, že konstrukce synbiotické směsi je založená na podrobně charakterizovaných, prokazatelných probiotických vlastnostech šesti kmenů bakterií mléčného kvašení, dá se předpokládat i její ochranný účinek vůči dalším původcům průjmů u selat, jako jsou například bakterie *Clostridium perfringens* či *Salmonella enterica*. Z tohoto důvodu lze očekávat potenciální uplatnění této kompozice v chovech prasat v prevenci podstavových průjmů selat, což v důsledku může vést jednak ke snížení spotřeby antibiotik, ale také k omezení finančních ztrát v chovech prasat.

7. Seznam použité související literatury

1. TANG, X., XIONG, K., FANG, R., LI, M. Weaning stress and intestinal health of piglets: A review. Front Immunol. 2022;13:1042778.
2. PEREIRA, WA., FRANCO, S. M., REIS, I. L., MENDONÇA, C. M. N., PIAZENTIN, A. C. M., AZEVEDO, P. O. S., TSE, M. L. P., DE MARTINIS, E. C. P., GIERUS, M., OLIVEIRA, R. P. S. Beneficial effects of probiotics on the pig production cycle: An overview of clinical impacts and performance. Vet Microbiol. 2022;269:109431.
3. YOUNAS, S., MAZHAR, B., LIAQAT, I., ALI, S., TAHIR, H. M., ALI, N. M. Bacteriocin production by lactobacilli and their role as antibacterial tool against common pathogens. J Oleo Sci. 2022;71(4):541-550.
4. LIAO, S. F., NYACHOTI, M. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. Anim Nutr. 2017;3(4):331-343.

5. FUOCHI, V., PETRONIO, G. P., LISSANDRELLO, E., FURNERI, P. M. Evaluation of resistance to low pH and bile salts of human *Lactobacillus* spp. isolates. Int J Immunopathol Pharmacol. 2015;28(3):426-33.
6. RUIZ, L., MARGOLLES, A., SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Front Microbiol. 2013;4:396.
7. MUSCARIELLO, L., DE SIENA, B., MARASCO, R. *Lactobacillus* cell surface proteins involved in interaction with mucus and extracellular matrix components. Curr Microbiol. 2020;77(12):3831-3841.
8. LI, M., WANG, Y., CUI, H., LI, Y., SUN, Y., QIU, H.J. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of a wild boar as potential probiotics. Front Vet Sci. 2020;7:49.
9. ZHONG, Y., FU, D., DENG, Z., TANG, W., MAO, J., ZHU, T., ZHANG, Y., LIU, J., WANG, H. Lactic acid bacteria mixture isolated from wild pig alleviated the gut inflammation of mice challenged by *Escherichia coli*. Front Immunol. 2022;13:822754.
10. JAIN, C., RODRIGUEZ-R, L. M., PHILLIPPY, A. M. *et al.* High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat Commun. 2018; 5114.
11. EGERVÄRN, M., DANIELSEN, M., ROOS, S., LINDMARK, H., LINDGREN, S. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. J Food Prot. 2007;70(2):412-8.
12. KLOSE, V., BAYER, K., KERN, C., GOELß, F., FIBI, S., WEGL, G. Antibiotic resistances of intestinal lactobacilli isolated from wild boars. Vet Microbiol. 2014;168(1):240-4.
13. OJHA, A. K., SHAH, N. P., MISHRA, V. Conjugal transfer of antibiotic resistances in *Lactobacillus* spp. Curr Microbiol. 2021;78(8):2839-2849.
14. CREUS, E., PÉREZ, J. F., PERALTA, B., BAUCELLS, F., MATEU, E. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. Zoonoses Public Health. 2007;54(8):314-9.
15. MARTINS, C. F., TREVISI, P., COELHO, D. F., CORREA, F., RIBEIRO, D. M., ALFAIA, C. M., PINHO, M., PESTANA, J. M., MOURATO, M. P., ALMEIDA, A. M., FONTES, C. M. G. A., FREIRE, J. P. B., PRATES, J. A. M. Influence of *Chlorella vulgaris* on growth, digestibility and gut morphology and microbiota of weaned piglet. Sci Rep. 2022;12(1):6012.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1910351 „Divoká a domácí prasata jako zdroj probiotických kultur a vliv technologických postupů přípravy a skladby synbiotického krmiva na jeho efektivitu a funkčnost“ a s institucionální podporou Ministerstva zemědělství RO0523.

VÚVeL

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz