



FUNKČNÍ VZOREK

**Bakteriální směs pro fermentaci krmiva
pro odstavená selata**

**Mgr. Zuzana Seidlerová Ph.D.
MVDr. Jitka Matiašovicová Ph.D.
Prof. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.**

6416
2025

Bakteriální směs pro fermentaci krmiva pro odstavená selata

Funkční vzorek

6416/2025

Autoři

Mgr. Zuzana Seidlerová Ph.D.

MVDr. Jitka Matiašovicová Ph.D.

Prof. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu

„Trvale udržitelná produkce selat do a po odstavu spojená se zvýšením welfare“,

QK23020036

ISBN 978-80-7672-064-0

2025

Obsah

1.	Úvod	3
2.	Předmět funkčního vzorku	3
3.	Vlastní popis funkčního vzorku	4
4.	Srovnání „novosti postupů“	9
5.	Uplatnění funkčního vzorku	10
6.	Ekonomické aspekty	10

1. Úvod

V životě prasat existují dvě kritická období, kdy se ve zvýšené míře vyskytují infekce trávicího traktu. První je bezprostředně po narození a druhé po odstavu. V obou případech se nabízí podávání probiotických kultur, které by zmírnily dynamiku změn ve střevní mikroflóře. Probiotické kultury lze selektovat buď mezi baktériemi, které se v daném životním období v trávicím traktu vyskytují, anebo lze využít kompromisní přístup, který využívá bakterie nepatřící mezi dominantní kmeny z trávicího traktu, ale které mají určité výhodné vlastnosti i mimo hostitele. Mezi první skupinu bakterií charakteristické pro trávicí trakt patří např. zástupci rodu *Bacteroides*, které testujeme jako probiotika pro novorozená selata nebo zástupci rodu *Prevotella*, která testujeme jako probiotika pro selata po odstavu. Protože však podání různých směsí bakterií rodu *Prevotella* nevedlo k přesvědčivým výsledkům u odstavených selat, testujeme i další možnosti. Jednou z nich je použití druhého typu bakterií dle klasifikace výše. Mezi takové bakterie patří laktobacily nebo bifidobaktérie. Tyto bakterie se sice v trávicím traktu vyskytují, ale nepatří mezi dominantní rody. K průměrné schopnosti osídlovat trávicí trakt však doplňují další užitečné vlastnosti, mezi které lze zahrnout jejich pomnožení i v mikroaerofilním prostředí a fermentativní metabolismus vedoucí ke snížení pH v jejich prostředí. Laktobacily pozastavují jejich metabolismus, až pokud svou metabolickou aktivitou sníží pH v prostředí výrazně pod hodnotu 5. Takové pH však vede k inaktivaci všech běžných bakterií jako jsou *E. coli* nebo salmonely. Krmivo fermentované laktobacily je tak prosté nežádoucích bakterií, a navíc se jeho konzumací do trávicího traktu doplňují prospěšné bakterie a částečně přednatrávené krmivo. Proto jsme vybrali 3 zástupce bakterií mléčného kvašení, které se vyskytují v trávicím traktu prasat a ověřili jejich schopnost potlačit pomnožení nežádoucí mikroflóry v krmivu.

2. Předmět funkčního vzorku

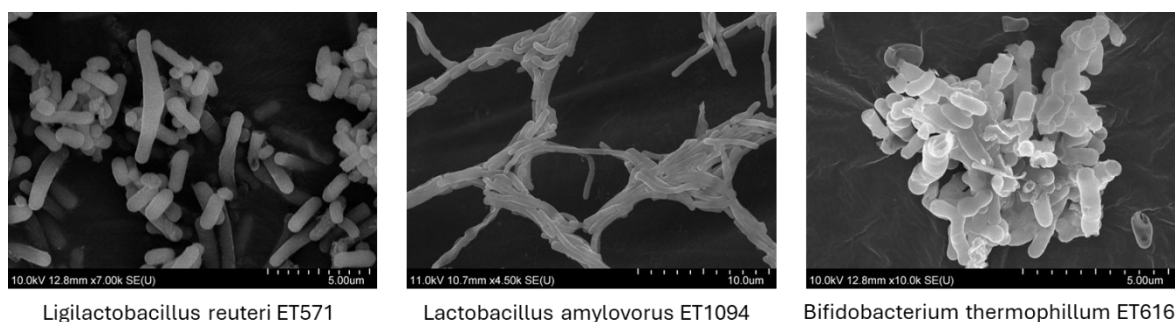
Předmětem funkčního vzorku je mikrobiální preparát sestávající se ze 3 různých bakterií, a to *Lactobacillus amylovorus* ET1094, *Ligilactobacillus reuteri* ET571 a *Bifidobacterium thermophilum* ET616. Tato směs se používá pro fermentaci krmiva, které je následně určeno pro podání selatům po odstavu.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

V naší laboratoři se dlouhodobě zabýváme významem střevní mikroflóry v ochraně prasat před patogenními mikroorganismy. Jednou z možností, která nevylučuje kombinaci s jinými přístupy, je příprava fermentovaného krmiva pro selata po odstavu.

Kontrola bakterií ze směsi LactoMix

Použité bakterie, *Lactobacillus amylovorus* ET1094, *Ligilactobacillus reuteri* ET571 a *Bifidobacterium thermophilum* ET616 byly detailně charakterizovány. U *Lactobacillus amylovorus* ET1094 a *Bifidobacterium thermophilum* ET616 byla stanovena celogenomová sekvence a všechny tři bakterie byly vizualizovány i elektronovou mikroskopií (Obr. 1). Všechny bakterie byly původně izolovány ze vzorku trusu prasat a tak mimo fermentaci krmiva mohou v trávicím traktu fungovat i jako probiotické kultury.

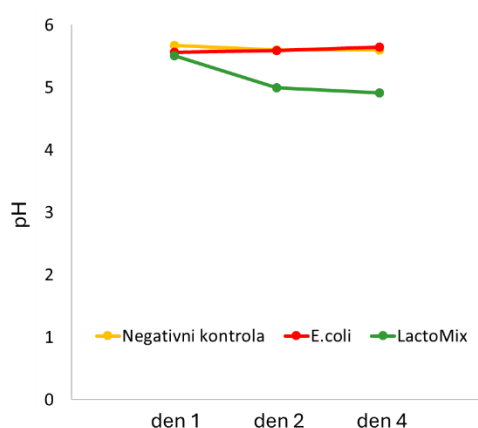


Obrázek 1. Elektronmikroskopická vizualizace čistých kultur bakterií ze směsi LactoMix.

pH krmiva po fermentaci bakteriemi

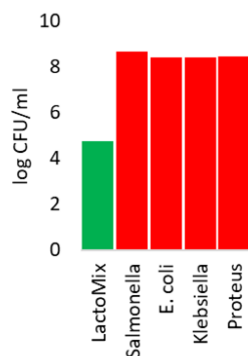
Nejprve bylo otestováno, zda připravená směs bakterií mléčného kvašení snižuje pH fermentovaného krmiva. Krmivo bylo sterilizováno autoklávováním a 25 gramů sterilního krmivo bylo promícháno s 25 ml BHI bujónu. Výsledná směs měla povahu vlhké, ale sypké směsi. Kontrolní krmivo bylo promícháno pouze se sterilním BHI bujónem. V případě zaočkování krmiva bakterií *E. coli* nebo směsí LactoMix bylo 100 µl tekuté kultury *E. coli* zaočkováno do 25 ml bujónu a ten byl poté promíchán s krmivem. V případě LactoMix bylo 25 ml bujónu zaočkováno 30 µl tekuté kultury každé z použitých bakterií, tedy *Lactobacillus amylovorus* ET1094, *Ligilactobacillus reuteri* ET571 a *Bifidobacterium thermophilum* ET616. Poté byly inkubační nádoby uzavřeny a inkubace probíhala v anaerobním prostředí po dobu 96 hodin (4 dnů). Po 24, 48 a 96 hodinách inkubace bylo odebráno přibližně 0,5 g

fermentovaného krmiva, které bylo resuspendováno v 5 ml destilované vody a ve vodné fázi bylo stanoveno pH. Po použití sterilního média nebo i média záměrně kontaminovaného *E. coli* nedocházelo k poklesu pH a pH trvale zůstávalo okolo hodnoty 5,6 (Obr. 2). Pokud ale byl bujón a následně i krmivo zaočkován směsí LactoMix, dva dny po zaočkování došlo k poklesu pH na hodnotu 4,9. V tomto experimentu byly stanoveny i počty bakterií avšak konzistence krmiva neumožňovala pomnožení *E. coli* (řádově 10^4 CFU na gram krmiva po 24 hodinách inkubace a úplná absence po 2 a 4 dnech). Proto se v následujících experimentech smíchávalo 25 gramů sterilního krmiva a 50 ml BHI bujónu.



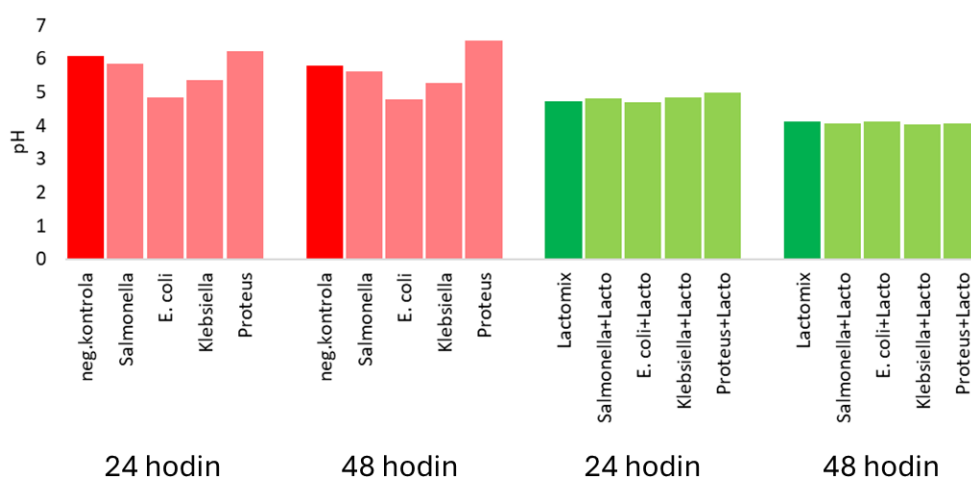
Obrázek 2. Pokles pH po fermentaci krmiva směsí LactoMix. Dva dny po zaočkování krmiva směsí LactoMix došlo k poklesu pH pod hodnotu 5. V případě zaočkování krmiva kulturou *E. coli* nebo jen zvlhčení krmiva sterilním bujónem nebyl zaznamenán žádný pokles v pH a to se pohybovalo okolo hodnot 5,6.

V navazujícím experimentu se smíchalo 25 gramů sterilního krmiva a 50 ml BHI bujónu, který byl zaočkován buď monokulturami nežádoucích bakteriálních druhů (*E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*), nebo jen směsí LactoMix, nebo směsí LactoMix a současně jedním z nežádoucích druhů bakterií. Přitom inokulum směsi LactoMix záměrně obsahovalo 1000x méně bakterií než inokulum *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* a *Proteus* (Obr. 3).



Obrázek 3. Zastoupení životaschopných bakterií ve směsi LactoMix a vybraných oportunně patogenních bakterií. Baktérie směsi LactoMix byly na počátku experimentu záměrně znevýhodněny a do krmiva byly zaočkovány v 1000x nižších počtech.

Větší podíl tekutého média vedl k růstu bakterií do vyšších počtů a současně k výraznějším změnám v pH. pH media smíchaného s krmivem bylo 6,1 po 24 hodinové a 5,9 po 48 hodinové inkubaci. Po zaočkování monokulturami *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* nebo *Proteus* se v případě *Salmonella* pH nelišilo od pH neinfikovaného krmiva. Kultivace *E. coli* a *Klebsiella* vedla k poklesu pH, v případě *E. coli* až k hodnotám 4,8. Po zaočkování krmiva *Proteus* došlo naopak ke zvýšení pH a to na hodnotu 6,2 po 24 hodinách a 6,5 po 48 hodinách inkubace. Pro všechny testované bakterie platilo, že pH se mezi 24 a 48 hodinami inkubace podstatně neměnilo. Po zaočkování krmiva směsí LactoMix nebo směsí LactoMix a současně jedním z nežádoucích druhů bakterií došlo po 24 hodinové inkubaci k poklesu pH na hodnoty 4,7-5,0 a pH se během dalších 24 hodin inkubace snižovalo až na hodnoty 4,0-4,1 (Obr. 4).

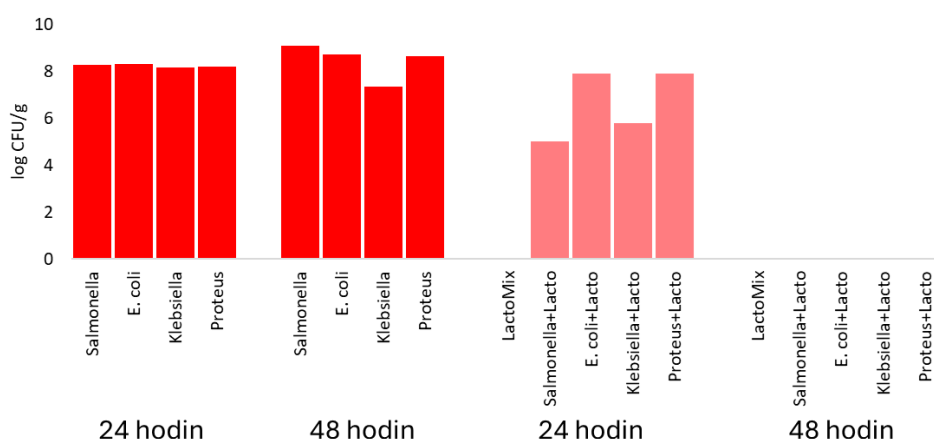


Obrázek 4. pH krmiva po kultivaci bakterií. Po zaočkování krmiva čistými kulturami oportunně patogenními bakteriemi došlo k mírným změnám v pH během prvních 24 hodin kultivace. V případě zaočkování krmiva směsí

LactoMix došlo k rychlému poklesu pH už během prvních 24 hodin inkubace a pokles pH až pod hodnotu 4 pokračoval v průběhu dalších 24 hodin.

Počty nežádoucích bakterií během fermentace

Po zaočkování krmiva monokulturami *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* nebo *Proteus* se jejich počty po 24 hodinách pohybovaly okolo 2×10^8 CFU/g. Během další 24hodinové inkubace došlo k dílčímu zvýšení počtů bakterií v případě *E. coli*, *Salmonella* a *Proteus*. V případě *Klebsiella* došlo mezi 24 a 48 hodinami kultivace naopak k poklesu v počtu životaschopných bakterií na gram krmiva (Obr. 5). Pokud se však nasadily *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* nebo *Proteus* nasadily do krmiva současně se směsí LactoMix, tak už po prvních 24 hodinách kofermentace byly pozorovatelný pokles v jejich počtech, a to i přes to, že do krmiva byly *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* nebo *Proteus* na počátku zaočkovány v tisícinásobně vyšších počtech než bakterie směsi LactoMix. Nejvnímavější k inaktivaci byla *Salmonella* a *Klebsiella*. Po 48 hodinách kofermentace pak došlo k úplné inaktivaci všech oportunně patogenních bakterií (Obr. 5).

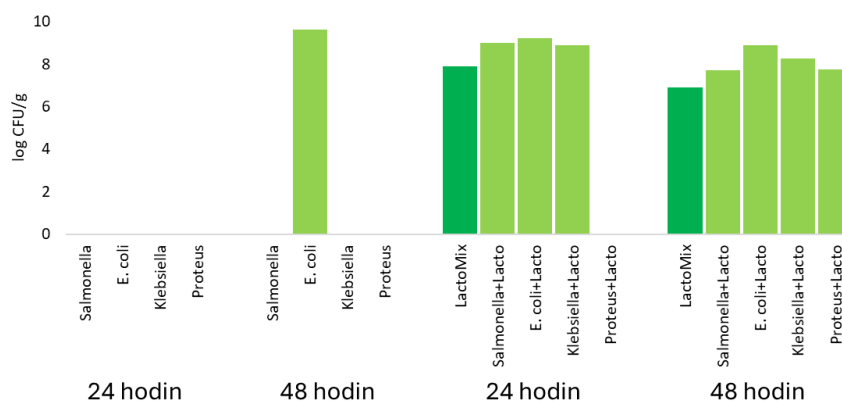


Obrázek 5. Počty oportunně patogenních mikroorganismů v anaerobně inkubovaném krmivu. Monokultury nebo směsi s LactoMix byly zaočkovány do krmiva. Počty *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* a *Proteus* byly stanoveny po výsevu na BHI agar a aerobní kultivaci při 37 °C. Žádná z bakterií ze směsi LactoMix za takových podmínek netvořila samostatné kolonie.

Počty bakterií LactoMix ve fermentovaném krmivu

Baktérie z produktu LactoMix tvořily ve fermentovaném krmivu 10^8 až 10^9 CFU/g krmiva po 24 hodinách fermentace a 10^7 až 10^9 CFU/g po 48 hodinové fermentaci (Obr. 6). Pokles pH krmiva a nastolení podmínek v krmivu, které vedly k inaktivaci *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* a *Proteus* tak lze dát do přímé souvislosti s růstem a biologickou aktivitou bakterií z produktu. Pro použití

fermentovaného krmiva pro odstavená selata tak lze doporučit dvoudenní fermentaci spojenou s kontrolou pH před podáním krmiva selatům. Mimo mikrobiologickou bezpečnost bude takové krmivo i částečně přednatrávené a snadno vstřebatelné selaty. *Lactobacillus amylovorus* ET1094, *Ligilactobacillus reuteri* ET571 a *Bifidobacterium thermophilum* ET616 pocházejí z trávicího traktu prasat a tak lze očekávat i jejich pozitivní vliv na trávicí trakt ve smyslu podávání probiotických kultur.

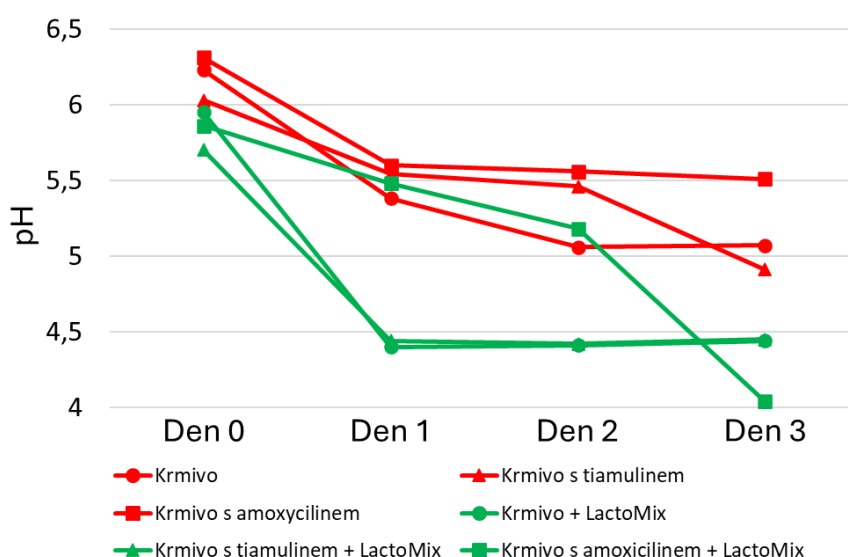


Obrázek 6. Počty bakterií LactoMix ve fermentovaném krmivu. Baktérie z produktu LactoMix byly prokazovány anaerobní kultivací na MRS agaru. Za těchto podmínek netvořily kolonie oportunně patogenní bakterie. V jednom případě (krmivo 48 hodin po zaočkování monokulturou *E. coli*) byl zachycen růst na MRS agaru. V tomto případě mohlo dojít k postupnému pomnožení bakterií rodu *Bacillus*, jejichž spóry dokáží přežít i autoklávování a po zvlhčení krmiva mohou obnovit růst. Baktérie ze směsi LactoMix dosahovaly počtů 10^8 až 10^9 CFU/g po 24 hodinové kultivaci. Po 48 hodinách kultivace došlo k jejich mírnému poklesu, zřejmě v důsledku okyselení prostředí.

Vliv suplementace antibiotiky na schopnost fermentace směsí LactoMix

Protože v reálných provozech se v odůvodněných případech používá i krmivo medikované antibiotiky, poslední test byl zaměřen na možnost fermentace krmiva s přídatkem amoxycilinu nebo tiamulinu. Na rozdíl od předchozích experimentů nebylo toto krmivo před zaočkováním směsí LactoMix autoklávováno. Na počátku experimentu se pH krmiva pohybovalo okolo hodnoty 6. pH krmiva bez inokulace směsí LactoMix v průběhu testu pokleslo k hodnotám 5-5,5. Naproti tomu, pH krmiva bez antibiotik a krmiva s tiamulinem zaočkované směsí LactoMix kleslo během prvních 24 hodin na hodnotu 4,5 a po další 2 dny se již nezměnilo. Suplementace krmiva amoxycilinem měla negativní vliv na proliferaci bakterií ze směsí LactoMix, protože první dva dny po inokulaci se pH snížilo jen k hodnotám 5-5,5, tedy stejně jako u kontrolních směsí krmiv bez zaočkování směsí LactoMix. Až mezi 48 až 72 hodinami fermentace došlo ke

snížení pH až na hodnotu 4. Amoxycilin tedy v počáteční fázi fermentace inhiboval metabolickou aktivitu bakterií ze směsi LactoMix a zřejmě až se jeho aktivita spontánně snížila po dvoudenní inkubaci při 37 °C, mohlo dojít k proliferaci bakterií mléčného kvašení a k poklesu pH (Obr. 7). Z důvodů předběžné opatrnosti tedy nelze směs LactoMix doporučit k fermentaci krmiva suplementovaného amoxycilinem. Naopak suplementace tiamulinem nemá na metabolickou aktivitu bakterií směsi LactoMix žádný význam. V případě obou typů suplementace však zůstává nejasná přítomnost biologicky aktivní formy antibiotik po fermentaci. U amoxycilinu se dá očekávat pokles jeho aktivity ve fermentovaném krmivu, protože až jeho spontánní rozpad zřejmě umožnil multiplikaci bakterií mléčného kvašení. V případě tiamulinu je situace nejasná, protože tiamulin nebránil poklesu pH hned od počátku experimentu. Baktérie z produktu LactoMix tedy mohly být k jeho působení rezistentní a tiamulin mohl trvale setrvávat v prostředí fermentovaného krmiva.



Obrázek 7. Změny v pH krmiva suplementovaného antibiotiky. Červené linky, vývoj pH v čase u krmiva bez inokulace směsí LactoMix. Zelené linky, vývoj pH v čase u krmiva po inokulaci směsí LactoMix. Krmivo bylo bez suplementace antibiotiky (kroužky), nebo se suplementací tiamulinem (trojúhelníky) nebo amoxycilinem (čtverečky).

4. Srovnání „novosti postupů“

Výběr bakterií pro fermentaci vycházel z vlastních poznatků, které druhy laktobacilů a bifidobakterií se v trávicím traktu prasat vyskytují. Nejedná se tedy o náhodný výběr. Všechny

tři použité kmeny byly získány z trávicího traktu prasat a tak mimo samotnou fermentaci krmiva mají potenciál i kolonizovat trávicího traktu prasat. Většina podobných bakterií určených k fermentaci je nejasného původu, často z fermentovaných produktů kravského mléka. V tomto smyslu nelze náš produkt porovnávat s čímkoli podobným a jedná se o unikátní přístup k řešení problému, a to se všemi přínosy i riziky.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Fermentované krmivo snižující výskyt patogenních *E. coli* a dalších nežádoucích bakterií lze podávat selatům v prvních dnech po odstavu a snížit tak pravděpodobnost výskytu poodstavových průjmů. V tomto směru zvažujeme uplatnění tohoto funkčního vzorku, avšak zřejmě nikoli samostatně, ale v kombinaci s podáváním probiotických kultur obsahujících bakterie rodu *Prevotella* a v budoucnu i v kombinaci s bakteriofágy specifickými proti enterotoxigenním kmenům *E. coli*.

6. Ekonomické aspekty

V České republice se ročně se porazí přes 2 miliónu prasat. Všechna tato prasata mohou být po odstavu ošetřena probiotickými směsmi nebo fermentovaným krmivem. Zatím se problémy trávicího traktu řeší podáváním antibiotik, což je z pohledu chovatelů ekonomicky nejlevnější řešení. Připouštíme, že podávání probiotik v kombinaci s fermentovaným krmivem nebo bakteriofágy bude pro chovatele ekonomicky náročnější než podávání antibiotik. Avšak trvalý nárůst výskytu bakterií rezistentních k účinku antibiotik již v současnosti vede ke snížení jejich účinnosti, a proto se hledají alternativní přístupy. Nárůst rezistencí u patogenních bakterií přitom není významný jen pro chov hospodářských zvířat, ale má i přesah do humánní medicíny, kde již dochází k selhávání terapie dosud léčitelných infekcí. V takových situacích a po zohlednění ceny lidského života může být využití probiotik, fermentovaného krmiva a bakteriofágů v konečném důsledku levnější než používání antibiotik. S touto perspektivou přistupujeme k řešení našich projektů i tohoto funkčního vzoru.



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