

KONCENTRÁCIA ORGANICKÝCH KYSELÍN V TRÁVIACOM TRAKTE GNOTOBIOTICKÝCH PRASIATOK PO PREVENTÍVNEJ APLIKÁCII LAKTOBACILOV

Bomba, A., Gancarčíková, S., Nemcová, R., *Kaštel, R., Herich, R.

Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice

* Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

ZÁVER

V práci bol sledovaný vplyv krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácie *Lactobacillus casei* subsp. *casei* voči *E. coli* na aktuálnu aciditu, produkciu organických kyselín v tráviacom trakte a kolonizáciu jejuna *E. coli* 08: K88 u gnotobiotických prasiatok.

V prvom experimente, pri krátkodobej preventívnej aplikácii bola pokusná skupina (L-E) inokulovaná *Lactobacillus casei* subsp. *casei* vo veku 2, 3 a 4 dni. V druhom experimente, pri kontinuálnej aplikácii bola skupina L-E inokulovaná *L. casei* denne od 2. do 10. dňa života. Vo veku 5 dní boli prasiatka v oboch skupinách inokulované *E. coli* 08: K88. Každé inokulum obsahovalo 1×10^8 zárodkov v 1 ml a aplikovali sme ho raz denne. Pri krátkodobej aplikácii *L. casei* boli v pokusnej skupine L-E zaznamenané signifikantne vyššie pH obsahu jejuna ($p < 0,05$), nižšia koncentrácia kyseliny mliečnej a octovej v jejune a ileu, pričom inhibičný efekt *L. casei* voči adhézii *E. coli* na sliznicu jejuna bol nevýrazný.

Pri kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* bolo v pokusnej skupine L-E zistené prevažne nižšie pH tráviaceho traktu, vyššia koncentrácia kyseliny mliečnej a octovej v obsahu jejuna a ilea a nižšia koncentrácia kyseliny maslovej so signifikantným rozdielom v ileu ($p < 0,05$). Vo veku 10 dní pri kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* boli počty *E. coli* 08 : K88 adherovaných na sliznicu jejuna gnotobiotických prasiatok v skupine L-E ($5,6 \log 10 \text{ cm}^{-2}$) signifikantne nižšie ($p < 0,05$) ako v skupine E ($7,2 \log 10 \text{ cm}^{-2}$). Kontinuálna preventívna aplikácia *L. casei* voči *E. coli* mala pozitívny vplyv na produkciu kyseliny mliečnej, octovej a aktuálnu aciditu v tráviacom trakte gnotobiotických prasiatok a v porovnaní s kontrolou skupinou signifikantne znížila počet *E. coli* kolonizujúcich jejunum.

Kľúčové slová: *Lactobacillus casei*; *E. coli*; organické kyseliny; tráviaci trakt; gnotobiotické prasiatka

ÚVOD

Ochorenia tráviaceho traktu majú najväčší podiel na morbotite a mortalite prasiatok v ranom veku. Veľmi častým pôvodcom hnačkových ochorení prasiatok infekčnej etiologie sú rôzne kmene *Escherichia coli* (F a i r b r o t h e r, 1993). Aplikácia probiotík predstavuje jednu z efektívnych metód prevencie ochorení tráviaceho traktu. Probiotikum ako prirodený bioregulátor napomáha udržaniu rovnováhy črevnej mikroflóry a bráni kolonizácii tráviaceho traktu patogénnymi baktériami, ako sú enterotoxigénne *E. coli* (Á v i l a a k o l., 1995). Pre probiotické účely sa z mikroorganizmov najčastejšie využívajú laktobacily (F u l l e r, 1989).

Mechanizmus inhibičného efektu probiotík voči patogénom môže byť sprostredkovaný kompetíciou o adherenčné receptory na črevnej sliznici, kompetíciou o živiny, produkciou antibakteriálnych látok a stimuláciou imunitného systému (B r a s s a r t, S c h i f f r i n, 1997). Jedným z mechanizmov inhibičného efektu laktobacilov voči patogénom tráviaceho traktu je produkcia organických kyselín, predovšetkým kyseliny mliečnej a octovej (P i a r d, D e s m a z e a u d, 1991).

Cieľom tejto práce bolo študovať vplyv krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácie *Lactobacillus casei* voči *E. coli* na aktuálnu aciditu a koncentráciu organických kyselín v tráviacom trakte gnotobiotických prasiatok.

MATERIÁL A METÓDA

Do dvoch experimentov bolo celkovo zaradených 15 gnotobiotických prasiatok, ktoré boli získané hysterotómiou a odchovávané v izolátoroch. Prasiatka boli kfmené sušeným plnotučným mliekom (PMV, Hradec Králové, ČR). Chemické zloženie mlieka bolo nasledovné ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$): bielkoviny 273, tuk 253, laktóza 383, železo 0,004. Sušené mlieko bolo riedené v pomere 1 : 9. Prasiatka boli napájané 4 x denne, *ad libitum*.

V oboch experimentoch boli prasiatka rozdelené do pokusnej skupiny (L-E) a kontrolnej skupiny (E). V prvom experimente, pri krátkodobej preventívnej aplikácii bola skupina L-E inokulovaná *Lactobacillus casei* subsp. *casei* vo veku 2, 3 a 4 dni. V druhom experimente, pri kontinuálnej aplikácii bola pokusná skupina L-E inokulovaná *L. casei* subsp. *casei* denne, počas celého experimentu (od 2. do 10. dňa života). Vo veku 5 dní boli prasiatka v pokusnej (L-E) i kontrolnej skupine (E) v oboch experimentoch inokulované *E. coli* 08: K88. Každé inokulum obsahovalo 1×10^8 zárodkov v 1 ml. Prasiatka boli inokulované raz denne, v dávke 2 ml. *Lactobacillus casei* subsp. *casei* bol izolovaný z jejunum ciciaka. V *in vivo* experimentoch adheroval na sliznicu jejunum gnotobiotických prasiatok (10^4 – 10^5 cm $^{-2}$), produkoval kyselinu mliečnu, octovú a acetooctovú, H₂O₂ a inhiboval rast *E. coli* 08: K88 v *in vitro* experimentoch. Kmeň *E. coli* 08: K88 bol poskytnutý Ústavom mikrobiológie, ČAV, Praha, ČR.

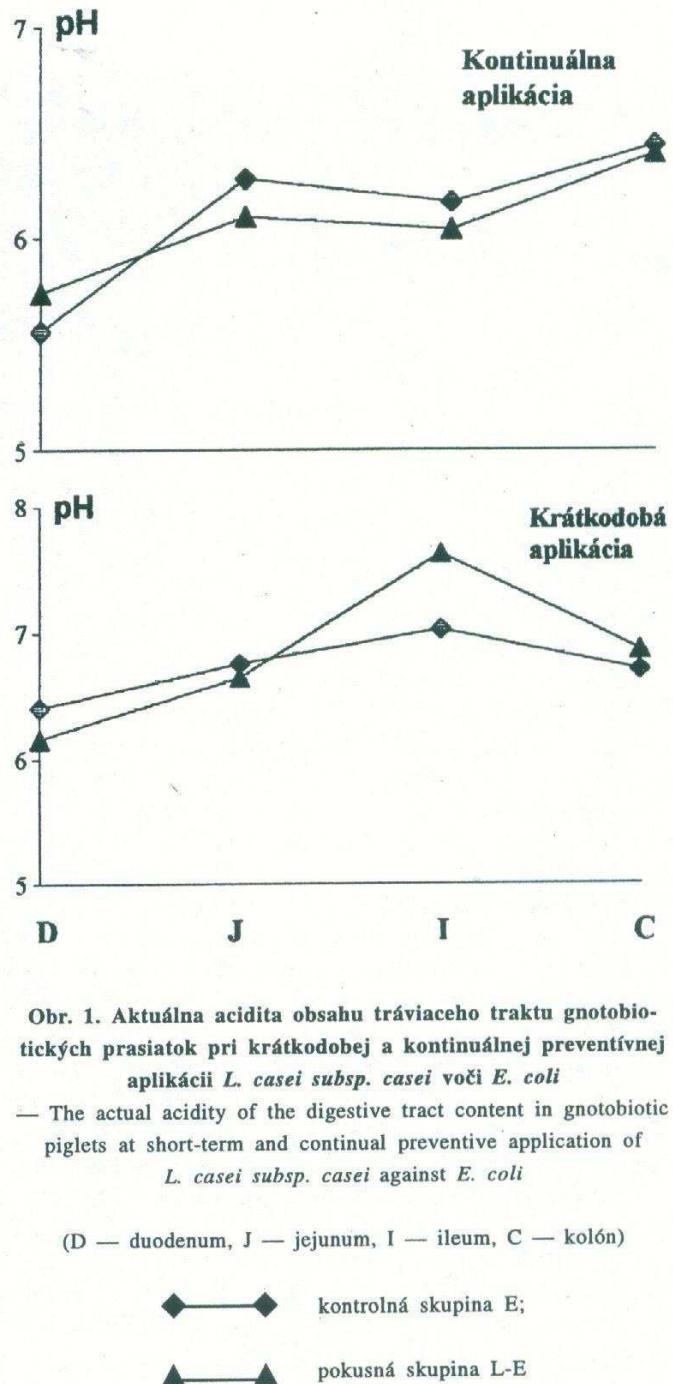
2 a 5 dní po inokulácii *E. coli* (vo veku 7 a 10 dní života) bolo odporazených 8 a 7 prasiatok. Ihneď po odporazení prasiatok bolo zmerané pH obsahu duodéna, jejunum, ilea a kôlona a odobraté vzorky obsahu a tkaniva jejunum a ilea. Tkaničkové vzorky jejunum a ilea boli vložené do 0,15 M PBS (pH 7,2), schladené na teplote 4 °C na 30 minút, 3 x premyté a zhomogenizované v homogenizátore pri 5 000 otáčkach za minútu. Počty *E. coli* boli stanovené na Mc Conkey agare.

Na meranie pH vzoriek obsahu tráviaceho traktu bol použitý pH meter MS 20 (Laboratórny prístroj, Praha, ČR). Kyselina mliečna, octová, propionová a maslová boli stanovené kapilárnom izotachoforézou. Ako vodiaci a zakončujúci elektrolyt boli použité 0,001 mmol/l kyselina chlorovodíková (pH 4,25) a 5 mmol/l kyselina kaprónová (pH 4,5). Na štatistické vyhodnotenie bol použitý *t*-test.

VÝSLEDKY

V prvom experimente pri krátkodobej preventívnej aplikácii *Lactobacillus casei* malo pH obsahu tráviaceho traktu gnotobiotických prasiatok vzostupný charakter od duodéna po ileum, s následným poklesom v kôlone, v oboch sledovaných skupinách. pH obsahu duodéna a jejunum dosahovalo nižších hodnôt u prasiatok v pokusnej skupine L-E, zatiaľ čo v ďalších úsekcích črevného traktu u prasiatok kontrolnej skupiny E so signifikantným rozdielom ($p < 0,05$) v ileu (skupina E 7,03 ± 0,16, skupina L-E 7,63 ± 0,22). Pri kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* vykazovalo pH tráviaceho traktu kolísavý charakter s najvyššími hodnotami v kôlone. Okrem duodéna, dosahovalo pH tráviaceho traktu gnotobiotických prasiatok nižších hodnôt v skupine L-E s najväčším rozdielom v jejunum (skupina E 6,28 ± 0,57, skupina L-E 6,1 ± 0,24), pričom rozdiely medzi skupinami neboli signifikantné (Obr. 1).

Pri krátkodobej aplikácii *L. casei* bola koncentrácia kyseliny mliečnej (Obr. 2) a kyseliny octovej (Obr. 3) v obsahu jejunum a ilea gnotobiotických prasiatok nižšia v skupine L-E v porovnaní so skupinou E. Naopak, pri



Obr. 1. Aktuálna acidita obsahu tráviaceho traktu gnotobiotických prasiatok pri krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* subsp. *casei* voči *E. coli*

The actual acidity of the digestive tract content in gnotobiotic piglets at short-term and continual preventive application of *L. casei* subsp. *casei* against *E. coli*

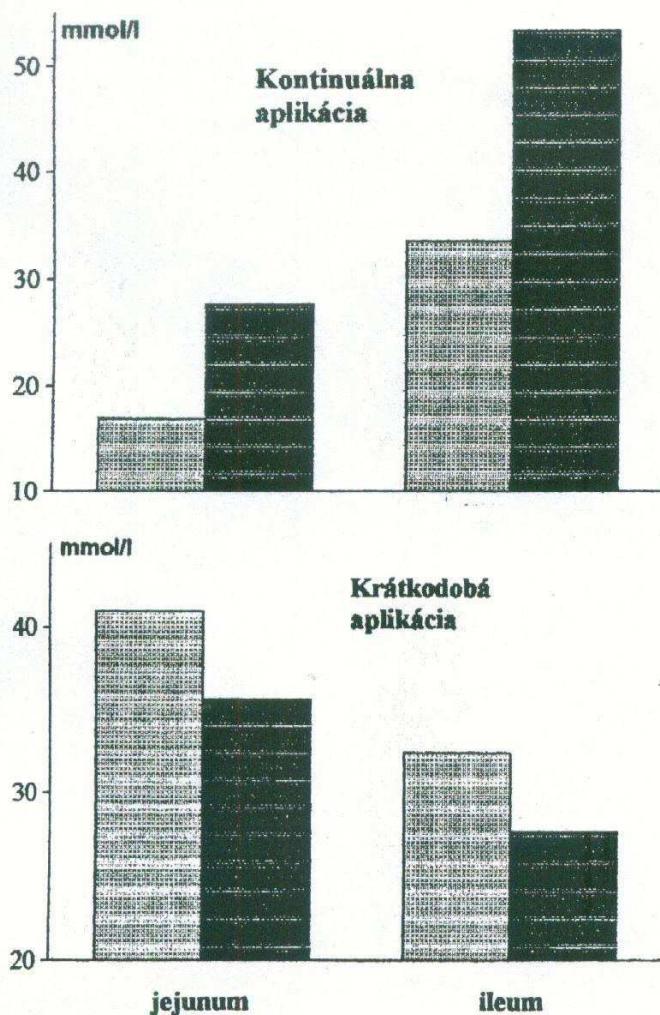
(D — duodenum, J — jejunum, I — ileum, C — kolón)

◆— kontrolná skupina E;

▲— pokusná skupina L-E

kontinuálnej aplikácii *L. casei* dosahovala koncentrácia oboch kyselín vyšších hodnôt v skupine L-E v jejunum i ileu. Pri kontinuálnej aplikácii boli rozdiely medzi sledovanými skupinami u kyseliny mliečnej (skupina E 33,5 ± 1,8 mmol.l⁻¹, skupina L-E 53,3 ± 13,1 mmol.l⁻¹) i kyseliny octovej (skupina E 17,3 ± 5,9, skupina L-E 24,5 ± 9,6) väčšie v ileu. Rozdiely medzi skupinami neboli signifikantné.

Štatisticky nevýznamné rozdiely medzi sledovanými skupinami boli zistené v koncentrácií kyseliny propiónovej, tak pri krátkodobej, ako aj kontinuálnej aplikácii *L. casei* (Obr. 4).

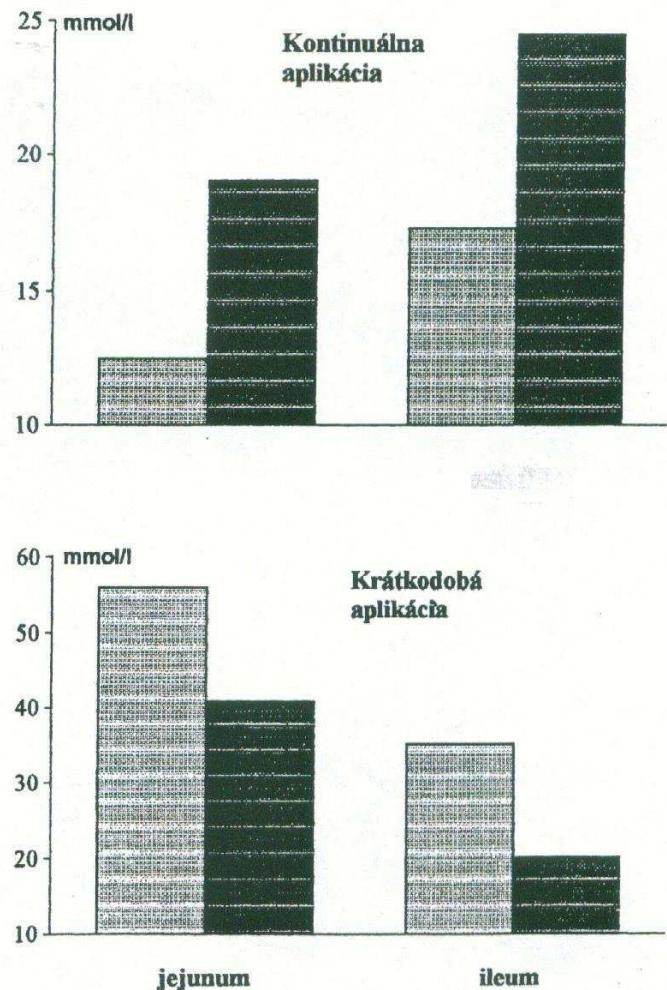


Obr. 2. Koncentrácia kyseliny mliečnej v obsahu jejuna a ilea gnotobiotických prasiatok pri krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* subsp. *casei* voči *E. coli*
— Concentration of lactic acid in the jejunum and ileum content of gnotobiotic piglets at short-term and continual preventive application of *L. casei* subsp. *casei* against *E. coli*

□ kontrolná skupina E
■ pokusná skupina L-E

Pri krátkodobej aplikácii *L. casei* bola koncentrácia kyseliny maslovej vyššia u gnotobiotických prasiatok skupiny L-E v obsahu jejuna a nižšia v obsahu ilea, bez signifikantných rozdielov. Koncentrácia kyseliny maslovej dosiahla pri kontinuálnej aplikácii *L. casei* v oboch sledovaných úsekoch tráviaceho traktu vyššiu hodnosť v skupine E, so signifikantným rozdielom v ileu (skupina E $2,7 \pm 0,9$ mmol.l⁻¹, skupina L-E $1,5 \pm 0,3$ mmol.l⁻¹, Obr. 5).

Vo veku 7 dní neboli zistené výrazné rozdiely v počtoch *E. coli* 08: K88 adherovaných na mukózu jejuna medzi sledovanými skupinami pri krátkodobej, ani pri kontinuálnej aplikácii *L. casei* subsp. *casei*. Vo veku 10 dní pri krátkodobej aplikácii *L. casei* adherovali *E. coli*



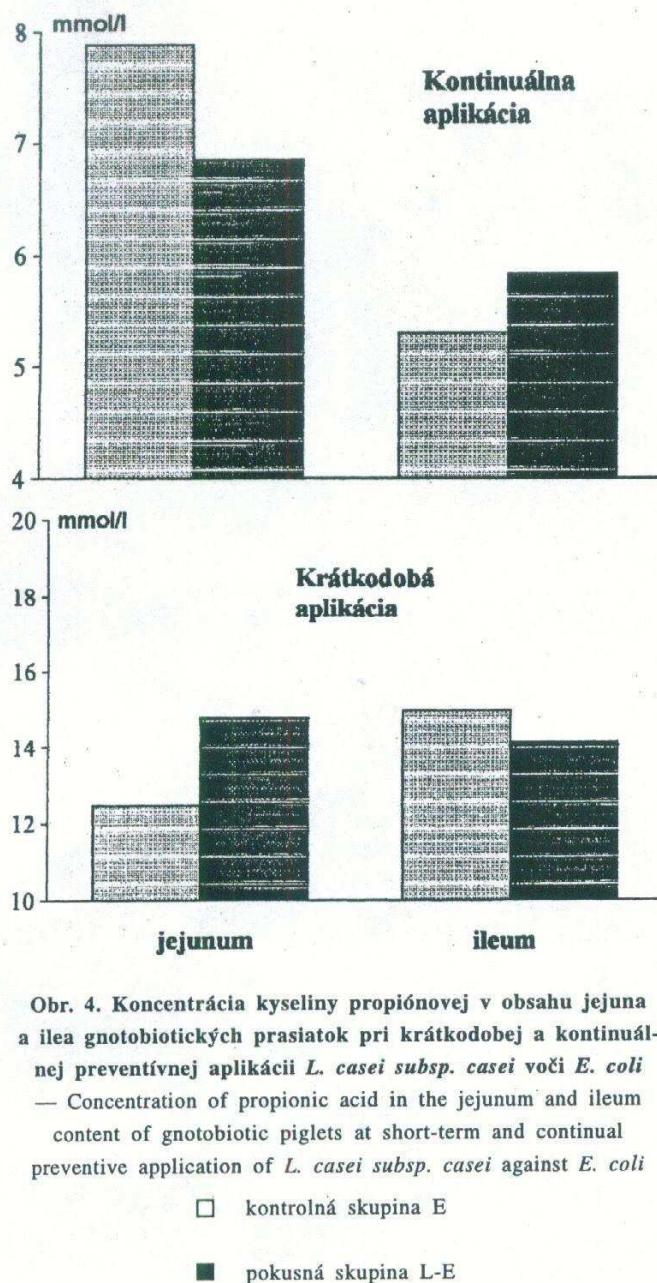
Obr. 3. Koncentrácia kyseliny octovej v obsahu jejuna a ilea gnotobiotických prasiatok pri krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* subsp. *casei* voči *E. coli*
— Concentration of acetic acid in the jejunum and ileum content of gnotobiotic piglets at short-term and continual preventive application of *L. casei* subsp. *casei* against *E. coli*

□ kontrolná skupina E
■ pokusná skupina L-E

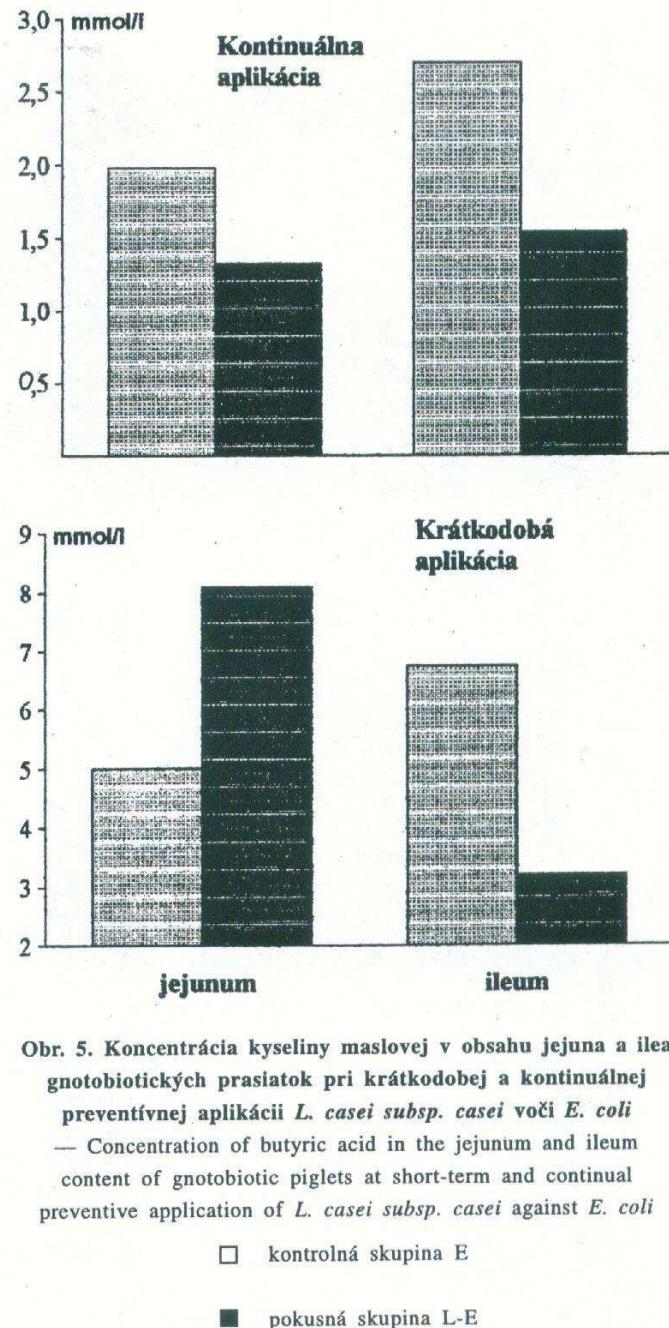
08: K88 na sliznicu jejuna gnotobiotických prasiatok v skupine E v počtoch $7,23 \log 10 \text{ cm}^{-2}$ a v skupine L-E v počtoch $6,98 \log 10 \text{ cm}^{-2}$. V rovnakom veku pri kontinuálnej aplikácii *L. casei* boli počty *E. coli* 08: K88 adherovaných na sliznicu jejuna prasiatok v skupine L-E ($5,6 \log 10 \text{ cm}^{-2}$) signifikantne nižšie ($p < 0,05$) ako v skupine E ($7,2 \log 10 \text{ cm}^{-2}$, Obr. 6).

DISKUSIA

Mechanizmus účinku probiotík nie je úplne objasnený a jednou z nezodpovedaných otázok je aj najvhodnejší časový interval aplikácie podmienujúci ich účin-



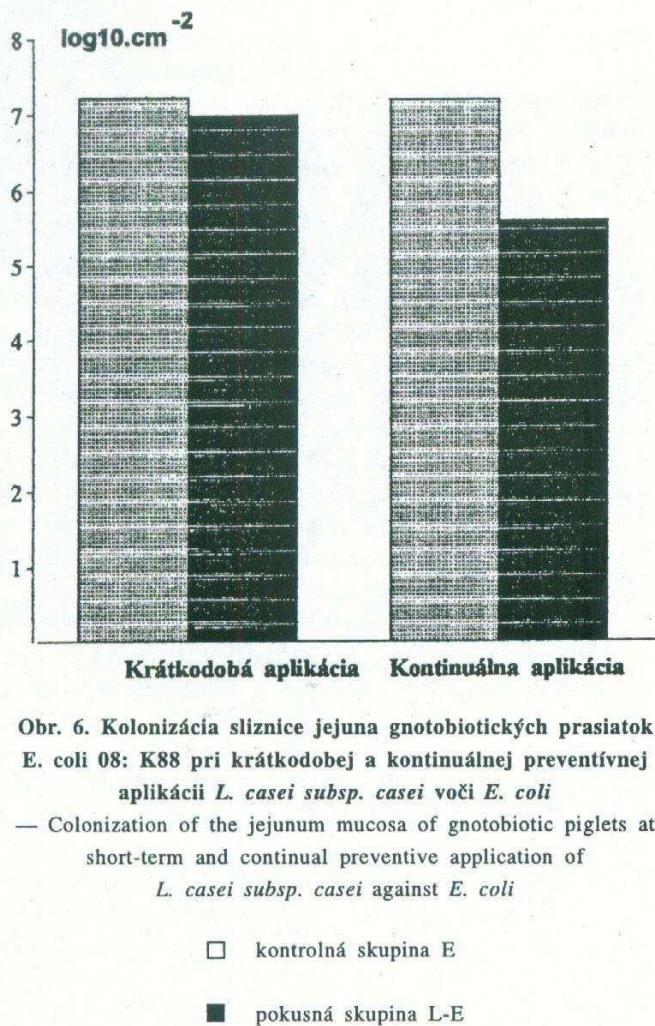
Obr. 4. Koncentrácia kyseliny propiónovej v obsahu jejuna a ilea gnotobiotických prasiatok pri krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* subsp. *casei* voči *E. coli*
— Concentration of propionic acid in the jejunum and ileum content of gnotobiotic piglets at short-term and continual preventive application of *L. casei* subsp. *casei* against *E. coli*



Obr. 5. Koncentrácia kyseliny maslovej v obsahu jejuna a ilea gnotobiotických prasiatok pri krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* subsp. *casei* voči *E. coli*
— Concentration of butyric acid in the jejunum and ileum content of gnotobiotic piglets at short-term and continual preventive application of *L. casei* subsp. *casei* against *E. coli*

nosť. Produkcia organických kyselín sa považuje za primárny regulátor črevnej mikrobiálnej aktivity a je jedným z mechanizmov inhibičného efektu laktobacilov voči patogénom (P i a r d, D e s m a z e a u d, 1991). Inhibičný efekt produkovaných organických kyselín voči patogénom je sprostredkováný znížením pH (B a b e l, 1977). U gnotobiotických prasiatok, ktorým bol kontinuálne preventívne aplikovaný *L. casei* sme zistili v porovnaní s kontrolou skupinou vyššiu koncentráciu kyseliny mliečnej a octovej v jejunu a ileu sprevádzanú nižším pH ich obsahu. Kontinuálna aplikácia *L. casei* mala výrazný inhibičný efekt voči adhézii *E. coli*, čo dokumentuje signifikantne nižší počet *E. coli* adheroványch na sliznicu. Pri krátkodobej preventívnej aplikácii *L. casei* sme zistili u pokusnej skupiny v porovnaní s kontrolou nižšiu koncentráciu kyseliny mliečnej a oc-

tovej v jejunu a ileu, signifikantne vyššie pH obsahu jejuna, pričom inhibičný efekt *L. casei* voči adhézii *E. coli* na sliznicu jejuna bol nevýrazný. B a r r o w a kol. (1977) zistili u odstavených prasiatok vo veku 4–10 dní života vysoko signifikantne negatívnu koreláciu medzi pH a koncentráciou kyseliny mliečnej v obsahu žaludka a pozitívnu koreláciu medzi pH a počtom *E. coli*. R o d t o n g a kol. (1993) sa domnievajú, že laktobacily môžu zvyšovať koncentráciu organických kyselín, znížovať pH čreva a inhibovať tak rast patogénnych baktérií. Výsledky tejto i našej predchádzajúcej práce (B o m b a a kol., 1996) poukazujú na to, že organické kyseliny produkované laktobacilmi môžu významnou mierou participovať na vytváraní ochranej bariéry tráviaceho traktu voči adhézii patogénov.



Obr. 6. Kolonizácia sliznice jejunum gnotobiotických prasiatok *E. coli* 08: K88 pri krátkodobej a kontinuálnej preventívnej aplikácii *L. casei* subsp. *casei* voči *E. coli*

— Colonization of the jejunum mucosa of gnotobiotic piglets at short-term and continual preventive application of *L. casei* subsp. *casei* against *E. coli*

- kontrolná skupina E
- pokusná skupina L-E

Najväčší inhibičný efekt z organických kyselín príslušujú W ong a C hen (1988) kyseline octovej, v dôsledku jej vyššieho pKa v porovnaní s kyselinou mliečnou. Inhibičná aktivita oboch kyselín stúpa s po-klesom pH (D al y a kol., 1972) a prejavuje sa synergický efekt kyseliny mliečnej a octovej voči *E. coli* a *Salmonellae enteritis* (A d a m s, H a l l, 1988). Kyselina mliečna znižuje pH média, čím sa zvyšuje toxicita kyseliny octovej. Synergický účinok popísali aj H i n t o n a H u m e (1995); laktát a sukcinát produkovaný črevnými baktériami inhiboval rast patogénov jednak tým, že obe kyseliny slúžili ako substrát pre baktérie produkujúce unikavé mastné kyseliny a zároveň znižením pH zvyšovali koncentráciu ich nedisociované formy.

Výsledky našej práce ukazujú, že kontinuálna preventívna aplikácia *L. casei* subsp. *casei* voči *E. coli* mala v porovnaní s krátkodobou preventívnu aplikáciou pozitívnejší vplyv na produkciu organických kyselín, aktuálnu aciditu a inhibíciu adhézie *E. coli* 08: K88 v tráviacom trakte gnotobiotických prasiatok. Kontinuálne skrmovanie fermentovaných mliečnych produktov napomáha udržaniu črevnej mikrobiálnej rovnováhy

a má preventívny vplyv voči hnačkovým ochoreniam (R y c h e n, S i m o e s N u n e s, 1995).

P e r d i g o n a kol. (1990) zistili veľmi výrazný protektívny efekt 8 dňového preventívneho skrmovania mlieka fermentovaného zmesou *L. casei* a *L. acidophilus* voči infekcii *Salmonella typhimurium* u myší. P e r d i g o n a kol. (1995) zistili že preventívny efekt aplikácie *L. casei* a jogurtu voči infekcii *Salmonella typhimurium* u myší bol závislý od doby jeho podávania.

Objasnenie mechanizmu účinku laktobacilov a iných mikroorganizmov si vyžaduje ďalšie intenzívne štúdium. Neobjasnenou otázkou je optimálny časový interval pre efektívnu aplikáciu probiotík. Naše výsledky poukazujú na výrazne vyššiu účinnosť kontinuálnej preventívnej aplikácie *L. casei* voči *E. coli* v porovnaní s krátkodobou aplikáciou.

LITERATÚRA

- Adams, M. R., Hall, C. J.: Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food technol.*, 23, 1988: 287—292.
- Ávila, F. A., Paulillo, A. C., Schocken-Iturrino, R. P., Lucas, F. A., Orgaz, A., Quintana, J. L.: A comparative study of the efficiency of a probiotic and the anti-K99 and anti -A14 vaccines in the control of diarrhea in calves in Brazil. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 48, 1995: 239—243.
- Babel, F. J.: Antibiosis by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 60, 1977: 815—821.
- Barrow, P. A., Fuller, R., Newport, M. J.: Changes in the microflora and physiology of the anterior intestinal tract of pigs weaned at 2 days, with special reference to the pathogenesis of diarrhea. *Infect. Immun.*, 18, 1977: 586—595.
- Bomba, A., Kaštel, R., Gancarčíková, S., Nemcová, R., Herich, R., Čížek, M.: The effect of Lactobacilli inoculation on organic acid levels in the mucosal film and the small intestine contents in gnotobiotic pigs. *Berl. Munch. Tierärztl. Wschr.*, 109, 1996: 428—430.
- Brassart, D., Schiffri, E. J.: The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.*, 8, 1997: 321—326.
- Daly, C., Sandine, W. E., Elliker, P. R.: Interactions of food starter cultures and food borne pathogens: *Streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. *J. Milk Food Technol.*, 35, 1972: 349—357.
- Fairbrother, J. M.: Les colibacilloses du porc. *Ann. Méd. Vét.*, 137, 1993: 369—375.
- Fuller, R.: Probiotic in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 1989: 365—378.
- Hinton, A., Hume, M. E.: Synergism of lactate and succinate as metabolites utilized by Veillonela to inhibit the growth of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteridis* in vitro. *Avian Dis.*, 39, 1995: 309—316.
- Perdigon, G., Nader de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G., Pesce de Ruiz Holgado, A. A.: Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk

fermented with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Res.*, 57, 1990: 255—264.

Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Aguero, G., Gobbato, N.: Symposium: Probiotic bacteria for humans: Clinical systems for evaluation of effectiveness. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.*, 78, 1995: 1597-1606.

Piard, J. C., Desmazeaud, M.: Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 1991: 525—541.

Rodtong, S., Dobbins, S., Thode-Andersen, S., McConnell, M., Tannock, G.: Derivation of DNA probes for enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1993: 3871—3877.

Rychen, G., Simoes Nunes, C.: Effect des flores lactiques des produits laitiers fermentés: une base scientifique pour l'étude des probiotiques microbiens dans l'espèce porcine. *INRA Prod. Anim.*, 8, 1995: 97—104.

Tortuero, F., Rioperez, J., Fernandez, E., Rodriguez, M. L.: Response of piglets to oral administration of lactic acid bacteria. *J. Food Protect.*, 58, 1995: 1369—1374.

Wong, H. C., Chen, Y. L.: Effect of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1988: 2179—2184. Došlo 10. júna 1998

Došlo 10. júna 1998

Lektor: Vajda, V.

SUMMARY

BOMBA, A., GANCARČÍKOVÁ, S., KAŠTEL, R., NEMCOVÁ, R., HERICH, R.: Concentration of organic acids in the digestive tract of gnotobiotic piglets after preventive application of lactobacilli.

The effect of short-term and continual preventive application of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* against *E. coli* for the actual acidity, concentration of organic acids in the digestive tract and colonization of the jejunum with *E. coli* 08: K88 in gnotobiotic piglets was investigated. In the first experiment at the short-term preventive application, the animals of the experimental group (L-E) at the age of 2, 3 and 4 days were inoculated with *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. In the second experiment at the continual application, the group L-E was inoculated with *L. casei* daily from day 2 to 10 of the animal life. At the age of 5 days, piglets of both groups were inoculated with *E. coli* 08: K88. Each inoculum contained 1×10^8 germs in 1 ml and it was applied once a day. After short-term application of *L. casei* to the experimental group L-E, there was a significantly higher pH of the jejunum content ($p < 0.05$), lower concentration of lactic and acetic acids in the jejunum and ileum, while the inhibitory effect of *L. casei* to the adhesion of *E. coli* on the jejunum mucosa was not pronounced.

At the continual preventive application of *L. casei* to the experimental group L-E, there was a predominantly lower pH of the digestive tract, higher concentration of lactic and acetic acids in the jejunum and ileum content and lower concentration of butyric acid with a significant difference in the ileum ($p < 0.05$). At the continual preventive application of *L. casei* to the 10-day-old animals, the number of *E. coli* 08: K88 adhered to the jejunum mucosa in gnotobiotic piglets of the group L-E ($5.6 \log 10 \text{ cm}^{-2}$) was significantly lower ($p < 0.05$) than in the group E ($7.2 \log 10 \text{ cm}^{-2}$). The continual preventive application of *L. casei* against *E. coli* had a positive effect on production of lactic and acetic acids and actual acidity in the digestive tract of gnotobiotic piglets; and in comparison with the controls, significantly decreased the number of *E. coli* colonizing the jejunum.

Key words: *Lactobacillus casei*; *E. coli*; organic acids; digestive tract; gnotobiotic piglets



POTENCOVANÉ PROBIOTIKÁ PRE EFEKTÍVNEJŠIU PREVENCIU A TERAPIU CHOROB MLÁĎAT HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT

Bomba, A., Nemcová, R., Gancarčíková, S., Mudroňová, D., Jonecová, Z., Kvičová, J., Sciranková, L.
Výskumný ústav veterinárnej medicíny UVL, Komenského 73, 040 01 Košice, Slovenská republika

ÚVOD

Probiotiká sa začínajú čoraz výraznejšie uplatňovať v potravinárstve, poľnohospodárskej výrobe, humánnej i veterinárnej medicíne. Vzhľadom k tomu, že európska legislatíva predpokladá v roku 2006 zákaz používania antibiotík ako rastových stimulátorov v kŕmnych zmesiach pre hospodárske zvieratá, nadobúdajú alternatívne metódy optimalizácie rastu a prevencie chorôb zvierat mimoriadny význam. V súvislosti s ekologizáciou poľnohospodárstva a produkciou biopotravín sa uplatnia predovšetkým prístupy využívajúce aplikáciu prípravkov na báze prirodzených komponentov. Medzi prípravkami spĺňajúcimi uvedené kritérium majú významné postavenie preovšetkým probiotik. Probiotiká sú bio-pripravky obsahujúce živé mikroorganizmy, ktoré pozitívne ovplyvňujú zdravie hostiteľa (Fuller, 1992). Pozitívne biomedicínske účinky probiotík spočívajú v inhibícii patogénov tráviaceho traktu, optimalizácii trávenia, stimulácii imunitného systému, protinádorovom, protialergickom a anticholesterolovom pôsobení. Údaje o účinnosti probiotík v praxi sú však často protichodné. Zatiaľ čo mnohí autori referujú o vynikajúcich preventívnych účinkoch probiotík voči hnačkovým chorobám mláďat a ich rastovo stimulačnom efekte (Dept a a kol., 1988; Maeng a kol., 1989; Nousiainen, Setälä, 1993), iní autori uvedené skutočnosti nepotvrdili (Kornergay, Thomas, 1973; Bekáert a kol., 1996). Z uvedených skutočností jednoznačne vyplýva, že ak sa majú probiotiká stať reálnej alternatívou antibiotík, je potrebné dosiahnuť ich stabilne vysokú a porovnateľnú účinnosť s antibiotikami.

METÓDY OPTIMALIZÁCIE PROBIOTICKÉHO EFEKTU MIKROORGANIZMOV

Aby bolo možné účinne potencovať účinok probiotík, je potrebné dôkladne poznať mechanizmus ich efektu. Aj napriek množstvu poznatkov, nie je ešte zdáleka objasnený. Situácia sa komplikuje tým, že každý probiotický kmeň mikroorganizmu môže disponovať iným mechanizmom

alebo viacerými mechanizmami svojho účinku. To znamená, že ak chceme zvýšiť účinnosť konkrétnego probiotického mikroorganizmu, musíme poznáť akými spôsobmi účinkuje, a potom môžeme buď zintenzívniť tento jediný mechanizmus, alebo rozšíriť škálu mechanizmov jeho probiotickeho efektu. Účinnosť probiotík možno zvýšiť génovými manipuláciami, kombináciou viacerých kmeňov mikroorganizmov alebo kombináciou probiotík so synergicky pôsobiacimi komponentami. Uvažuje sa, že génovými manipuláciami by bolo výhodné spojiť schopnosť mikroorganizmov prežívať v tráviacom trakte so schopnosťou produkovať metabolity sprostredkujúce ich probiotický účinok (Fuller, 1998). Žiaľ, génové manipulácie mikroorganizmov skrývajú v sebe aj nebezpečenstvo prenosu antibiotikorezistence, a preto nepredpokladáme, že sa v probiotickej praxi výrazne uplatnia. Výhodou probiotík pozostávajúcich z viacerých kmeňov je ich účinnosť v rôznych podmienkach a u viacerých druhov zvierat. Je známe, že účinnosť probiotík je okrem iných faktorov, podmienená aj druhovou špecifitou produkčného kmeňa. U takýchto kombinácií môžu baktérie jedného rodu mikroorganizmov pôsobiť ako potenciálne rastové stimulátory baktérií iného rodu, ako to môže byť v prípade kombinácie baktérií z rodu *Bacillus* a rodov *Streptococcus* a *Lactobacillus* (Pollman a kol., 1980).

Z hľadiska praxe sa však najvhodnejšou možnosťou zvýšenia účinnosti probiotík javí kombinácia probiotických mikroorganizmov so synergicky pôsobiacimi komponentami prirodzeného pôvodu. Z komponentov naturálneho pôvodu, ktoré potenčujú probiotický efekt mikroorganizmov prichádzajú do úvahy prebiotiká (predovšetkým oligosacharydy), fytkomponenty, nešpecifické substráty, metabolity mikroorganizmov a mikroelementy (Gibson, Roberfroid, 1995; Yadava a kol., 1995).

SYNBIOTIKÁ

Synbiotiká sú kombináciou probiotík s prebiotikami. Za prebiotiká sú považované nestráviteľné kŕmne doplnky, ktoré

priaznivo ovplyvňujú hostiteľa selektívnu stimuláciu rastu alebo aktivity jedného alebo viacerých rodov baktérií v hrubom čreve. Prebiotiká musia splňať nasledujúce kritéria: a) nesmú byť hydrolyzovateľné ani absorbovatelné v tenkom čreve, b) musia byť selektívnym substrátom pre jeden rod alebo viaceré rody prospešných baktérií v hrubom čreve, ktorých rast alebo metabolická aktivita sa ním stimuluje, c) musia byť schopné optimalizovať zloženie mikroflóry hrubého čreva, d) vyvolávajú lokálne a systémové účinky, ktoré majú priaznivý vplyv na zdravie hostiteľa (Gibson, Roberfroid, 1995). Kombinácia probiotík a prebiotík sa nazýva synbiotiká a definuje sa ako zmes probiotických mikroorganizmov a prebiotík, ktorá pozitívne ovplyvňuje hostiteľa zvýšením prežívateľnosti a implantácie živých mikroorganizmov v tráviacom trakte aktivizáciou metabolismu jedného rodu alebo viacerých rodov zdraviu prospešných baktérií alebo selektívnu stimuláciu ich rastu (Gibson, Roberfroid, 1995). Experimentálne bol zaznamenaný pozitívny efekt aplikácie laktobacilov v kombinácii s fruktooligosacharidmi (Nemcová a kol., 1999) a mannanoligosacharidmi (Zobač, 1998) na zdravie, rast, konverziu krmiva a zloženie fekálnej mikroflóry.

POTENCOVANÉ PROBIOTIKÁ

Z uvedených poznatkov vyplýva, že synbiotiká sú bioprípravky, ktorých potencovaný protektívny a stimulačný efekt sa prejavuje len v hrubom čreve. Ak však berieme do úvahy patogenézu hnačkových chorôb mláďat, objavuje sa požiadavka ochrany sliznice celého tráviaceho traktu, t.z. aj tenkého čreva, aby sa predišlo jeho kolonizácii patogénnymi mikroorganizmami. Táto požiadavka nás viedla k vypracovaniu nového konceptu protekcie tráviaceho traktu, ktorý bol prezentovaný a akceptovaný koncom minulého roka na medzinárodnej konferencii „Probiotiká a zdravie“ v Londýne. Potencované probiotiká definujeme ako bioprípravky, ktoré obsahujú produkčné kmene mikroorganizmov a synergicky pôsobiacich komponentov prirodzeného pôvodu potenčujúcich ich probiotický efekt tak v tenkom ako aj v hrubom čreve



a ich prospešný vplyv na hostiteľa zintenzívnením jedného z mechanizmov alebo rozšírením škály mechanizmov ich probiotického účinku (Bomba a kol., 2002). Potencované probiotiká musia spĺňať nasledovné kritéria: 1) musia byť účinnejšie ako ich komponenty jednotlivovo, 2) ich potencovaný protektívny a stimulačný účinok sa musí prejavíť vo všetkých častiach tráviaceho traktu.

Berúc do úvahy uvedené skutočnosti, môžeme synbiotiká považovať za potencované probiotiká v tom prípade, ak sa doplnia o komponent, ktorý bude potencovať ich probiotický efekt aj v tenkom čreve. Možno predpokladať, že potencované probiotiká budú pravdepodobne viaczložkové prípravky. Prvé potencované probiotikum, ktoré bolo vyuvinuté na našom pracovisku bolo veľmi úspešne otestované v chove ošípaných v PD Perín. V roku 2000 bola zdravotná situácia v chove ciciakov a odstavčiat natoliko nepriaznivá, že sa rozhodli pre plošnú aplikáciu potencovaného probiotického prípravku na dobu jedného roka. Antibiotika boli z kŕmnych zmesí vylúčené a ich používanie sa obmedzilo len na liečebné účely. Potencované probioti-

máloživotaschopných prasiatok klesol z 51,4 % na 30,9 % (Obr. 2). Z hľadiska chorobnosti a úhybu mala preventívna aplikácia potencovaného probiotika lepší efekt ako podávanie antibiotík (Gancarčíková a kol., 2002).

VYUŽITIE POTENCOVANÝCH PROBIOTÍK VO VETERINÁRNEJ PRAXI

Najzávažnejší zdravotný i ekonomický problém v chove mláďat hospodárskych zvierat v ranom veku predstavujú choroby tráviaceho traktu. Diarhoický syndróm tepliar, ciciakov i odstavčiat spôsobuje významné straty vysokou chorobnosťou, úhynom, znížením hmotnostných prírastkov a vysokými nákladmi na liečivá. Terapia veľmi často prichádza neskoro. U mláďat obzvlášť platí, že predchádzať je oveľa výhodnejšie ako liečiť. Probiotiká sú ideálnym prostriedkom prevencie. Potláčajú patogénne mikroorganizmy, stimulujú imunitný systém, pôsobia protizápalovo a optimálne zlepšujú tráviace procesy. Vývojom potencovaných probiotík využívajúcich synergický efekt prospešných mikroorganizmov a naturálnych komponentov sa probiotiká stávajú veľmi účinnou alternatívou antibiotík. Pre efektívnu aplikáciu probiotík vo veterinárnej praxi u mláďat platí niekoľko zásad:

1. Používať len probiotické prípravky spĺňajúce všetky kritériá účinného probiotika (druhová špecifita, adhezívna schopnosť, inhibičný efekt, schopnosť prežívania v tráviacom trakte, bezpečnosť).
2. Najúčinnejšie sú probiotiká v čerstvom stave, ak sa aplikujú ihneď po ich príprave spolu s médiom.
3. Prvú dávku probiotika je potrebné podať čo najskôr po narodení, najneskôr s prvým mledzivom.
4. Zásadne nepoužívať probiotiká po exspiračnej dobe.
5. V chove ošípaných s vyššou koncentráciou je možné realizovať prevenciu hnačkových chorôb ciciakov aj aplikáciou probiotík vysokogravidným prasničiam.
6. Probiotiká je vhodné aplikovať prvých 7-10 dní života a v období odstavu (3 dni pred a 7 dní po odstave).

Ďalší výskum a vývoj v oblasti potencovania účinnosti probiotík bude zameraný na optimalizáciu aplikačnej formy probiotických prípravkov a zvýšenie ich účinnosti kombináciou so synergicky pôsobiacimi komponentami naturálneho pôvodu.

ZÁVER

Proces približovania sa ku krajinám Európskej únie prinesie vo veľmi blízkej budúcnosti aj zákaz používania antibiotík ako rastových stimulátorov. Ich vytelenovanie si vyžaduje aj nevyhnutná eko-logizácia živočíšnej výroby a produkcia kvalitných a bezpečných potravín. Probiotiká sa javia ako veľmi efektívna alternatíva antibiotík tak v prevencii chorôb ako aj v optimalizácii výživy mláďat zvierat. Vypracovali a overili sme nový koncept probiotík pre účinnejšiu prevenciu a terapiu mláďat – potencované probiotiká. Tieto prípravky sú kombináciou probiotických mikroorganizmov a synergicky pôsobiacich komponentov prirodzeného pôvodu. Potencované probiotiká preukázali svoju vysokú účinnosť pri znižovaní chorobnosti, úhybu a nákladov na liečbu. Ďalší výskum a vývoj sa bude orientovať na optimalizáciu aplikačnej formy a zvýšenie účinnosti probiotík ich kombináciou s komponentami potencujúcimi ich efekt tak v tenkom ako aj v hrubom čreve.

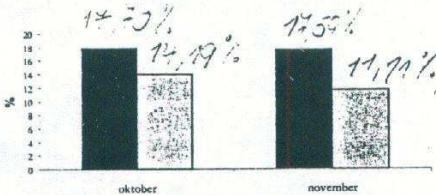
SUMMARY

BOMBA, A., NEMCOVÁ, R., GANCARČÍKOVÁ, S., MUDROŇOVÁ, D., JONECOVÁ, Z., KVIČOVÁ, J., SCIRANKOVÁ, L.: Potentiated probiotics for more effective prevention and therapy of diseases in young farm animals

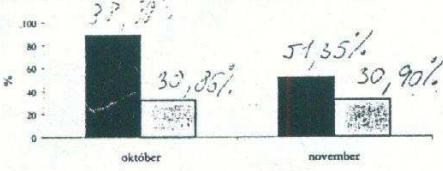
The process of approaching to the European Union countries will bring also prohibition of antibiotics as growth stimulators in the near future. The ecologisation of animal breeding and production of high quality and safety foods require the elimination of antibiotics. Probiotics could represent a very effective alternative to the use of antibiotics in prevention of disease and optimisation of nutrition in youngs. We have elaborated and verified a new concept of probiotics for more effective prevention and therapy of youngs – potentiated probiotics. These preparations are combination of probiotic microorganisms and synergically acting components of natural origin. Potentiated probiotics demonstrated their high efficiency by decreasing of morbidity, mortality and expenses on therapy. Further research will be oriented on optimisation of application form and on increasing of efficiency of probiotics by their combination with the components potentiating their effect in small intestine and colon.

Došlo 15. novembra 2002

Lektor: Lauková, A.
UFHZ SAV Košice



Obr. 1. Celkové úhyty prasiatok v období preventívnej aplikácie antibiotík (rok 2000) a potencovaného probiotíka (rok 2001) v krímných zmesiach – Total death of piglets in the period of preventive application of antibiotics (2000) and potentiated probiotics (2001) in feed mixtures



Obr. 2. Úhyt maloživotaschopných prasiatok v ranom veku v období preventívnej aplikácie antibiotík (rok 2000) a potencovaného probiotíka (rok 2001) – The death of little viable piglets in early age in the period of antibiotics application (2000) and potentiated probiotics (2001)

kum obsahovalo živú kultúru *Lactobacillus paracasei* a potencujúce komponenty národného pôvodu. Preventívna aplikácia potencovaného probiotického prípravku v kŕmnych zmesiach v novembri 2001 znížila oproti porovnatelnému obdobiu v roku 2000 pri preventívnej aplikácii antibiotík úhyt o 37 % (Obr. 1). Počet odstavených prasiatok stúpol z 82,4 na 88,9 a úhyt

Literatúra u autora