

PROBIOTINIŲ LAKTOBACILŲ PADERMIŲ ĮTAKA NAUJAGIMIŲ VERŠELIŲ MIKROBIOLOGINIAMS RODIKLIAMS FEKALIJOSE

Jonė Kantautaitė, Vaidas Oberauskas, Rasa Sutkevičienė, Antanas Sederevičius
*Anatomijos ir fiziologijos katedra, Virškinimo fiziologijos ir patologijos mokslinis centras
 Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;
 tel. (8~37) 36 36 92, faks. (8~37) 36 24 17; el. paštas: jone.kantautaitė@lva.lt*

Santrauka. Bandytas su naujagimiais veršeliais atliktas Lietuvos veterinarijos akademijos Virškinimo fiziologijos ir patologijos moksliniame centre bei Praktinio mokymo ir bandymų centre. Bandyto tikslas buvo nustatyti liofilizuotų probiotinių padermių mišinio *Lactobacillus plantarum* U-14 ir *Lactobacillus fermentum* U-5 įtaką kliniškai sveikų naujagimių veršelių mikrobiologiniams rodikliams fekalijose. Ištirpintas liofilizuotų probiotinių padermių mišinys, kuriame *L. plantarum* buvo 6×10^8 KfV/g (kolonijas formuojančių vienetų), *L. fermentum* 2×10^7 KfV/g, bandomosios grupės veršeliams buvo girdomas du kartus po 2 g per parą su krekenomis, vėliau – su pienu, 15 parų iš eilės.

Bifidobakterijoms nustatyti buvo naudojama Blauroko terpė (Баникова и др., 1987); koliforminėms bakterijoms – Levino agaras („Merck“, Vokietija), MacConkey agaras („Liofilchem“, Italija); mieliniams grybams – Sabūro agaras („Sifin“, Vokietija).

Nustatyta, kad probiotinės laktobacilų padermės palankiai veikė veršelių virškinamojo trakto mikroflorą, t. y. sumažino koliforminių bakterijų ($p < 0,05$) ir padidino bifidobakterijų ($p < 0,05$) kieki.

Raktažodžiai: veršeliai, fekalijos, laktobacilos, bifidobakterijos, koliforminės bakterijos.

THE EFFECT OF PROBIOTIC STRAINS OF LACTOBACILLUS ON THE MICROBIOLOGICAL PARAMETERS IN THE FAECES OF NEONATE CALVES

Jonė Kantautaitė, Vaidas Oberauskas, Rasa Sutkevičienė, Antanas Sederevičius
*Department of Anatomy and Physiology, The Research Center of Digestive Physiology and Pathology, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės str.18, 47181 Kaunas; Lithuania
 tel.+370 36 36 92, faks+370 36 24 17; e-mail: jone.kantautaitė@lva.lt*

Summary. The experiment was carried out with neonate calves at the Research Center of Digestive Physiology and Pathology, Lithuanian Veterinary Academy and the Center of Practical Training and Experiments. The aim of this investigation was to define the effect of a lyophilized mixture of probiotic preparations of *Lactobacillus plantarum* U-14 and *Lactobacillus fermentum* U-5 on the microbiological parameters in the faeces of clinically healthy neonate calves. The mixture of lyophilized probiotic strains consisting of 6×10^8 CFU/g (colony forming units) *L. plantarum* and 2×10^7 CFU/g *L. fermentum* was given to the calves of the experimental group ($n=6$) in the form of a solution of 2 g twice daily with colostrum or milk for 15 consecutive days. Samples of faeces were taken after morning feeding throughout the experiment. The calves of the control group ($n=6$) were not given probiotic preparations.

It was observed that both probiotic strains of lactobacillus positively affected the microflora of the digestive system of neonate calves: the count of coliform bacteria decreased ($p < 0,05$) while the count of bifidobacteria tended to increase ($p < 0,05$).

Key words: calves, lactobacillus, faeces, microflora.

Įvadas. Dėl veršelių virškinamojo trakto susirgimų gyvulininkystė patiria didžiulių nuostolių (Терехов, 1998; Bendali et al., 1999; Мищенко и др., 2001). Tarpsnis nuo gimimo iki 10 amžiaus dienos susijęs su daugeliu naujagimių fiziologinių ypatumų ir yra svarbus veršelių virškinamojo trakto ligų profilaktikoje (Терехов, 1998). Šiuo laikotarpiu, kol dar nesusiformavusi žarnyno biocianozė, imuninė, nervinė, endokrininė sistemos, sterilus veršelių virškinamasis traktas gali būti kolonizuojamas įvairiais mikroorganizmais. Pirmąsias 2–3 gyvenimo savaites virškinamojo trakto mikroflora gali būti charakterizuojama kaip disbakteriozė (Субботин, 2001; Субботин, Сидоров, 2004). Mikroorganizmų kiekybinė ir kokybinė sudėtis gali sąlygoti ligų atsiradimą. Esant mažam pienarūgščių bakterijų kiekiui padaugėja aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių

mikroorganizmų, kaip antai enterobakterijų, pseudomonų, enterokokų, stafilokokų, mielinių grybų, klostridijų. Padidėjus jų kiekiui ir sustiprėjus aktyvumui galimi virškinamojo trakto susirgimai (Brook, Ledney, 1994; Berg, 1996). Pienarūgštės bakterijos (laktobacilos, bifidobakterijos) virškinamajame trakte palaiko anaerobinių ir aerobinių mikroorganizmų santykį, saugo nuo disbakteriozės (Vandevoorde et al., 1991). Šių bakterijų produkuojami acetatai, laktatai, vandenilio peroksidas, lizocimas slopina sąlyginai patogeninės mikrofloros aktyvumą, palaiko rūgščių aplinkos reakciją. Taigi, norint slopinti virškinamajame trakte nepageidaujamos mikrofloros dauginimąsi ir jų aktyvumą, tikslinga, sugirdžius pirmą krekenų porciją, duoti įvairių probiotikų – gyvų antagonistiška aktyvių kultūrų, kurios prisijungtų prie epiteliocitų ir saugotų virškinamąjį traktą

nuo potencialių patogenų adhezijos (Тараканов, 2000; Овод, 2003). Probiotiniais preparatais tikslinga palaikyti ekosistemą, stimuliuoti imunitetą, gerinti pašaro virškinamumą ir medžiagų pasisavinimą (Tannock, 1997; Boehm et al., 2002; Montalto et al., 2002; Jukna ir kt., 2003; 2005; Моргунова и др., 2003; Stagg et al., 2004).

Ankstesniais laboratoriniais tyrimais nustatyta, kad pasirinkti laktobacilų kamienai *L. plantarum* ir *L. fermentum in vitro* pasižymėjo geromis probiotinėmis savybėmis (Oberauskas et al., 2004).

Darbo tikslas – nustatyti liofilizuotų probiotinių padermių *L. plantarum* ir *L. fermentum* poveikį naujagimių veršelių mikrobiologiniams rodikliams fekalijose.

Medžiaga ir metodai. Bandytas su naujagimiais veršeliais atliktas Lietuvos veterinarijos akademijos Virškinimo fiziologijos ir patologijos moksliniame centre bei Praktinio mokymo ir bandymų centre. Veršeliai laikyti atskiruose gardeliuose, girdyti motinos krekonomis, vėliau – su pienu. Sudarytos dvi sveikų veršelių grupės: kontrolinė (n=6) ir bandomoji (n=6). Ištirpintas liofilizuotų probiotinių laktobacilų kultūrų *L. plantarum* ir *L. fermentum* mišinys buvo girdomas kiekvienam bandomosios grupės veršeliui po 2 g du kartus per parą su krekonomis, vėliau – su pienu 15 parų iš eilės. Fekalijų mėginiai buvo imami po rytinio šėrimo 1; 5; 10; 15 parą. Skiediniai mikrobiologiniams tyrimams paruošti klasikiniu būdu iki 10^{-12} (Мед. микробиология, 1999). Daryta po du lygiagrečius mėginių pasėjus.

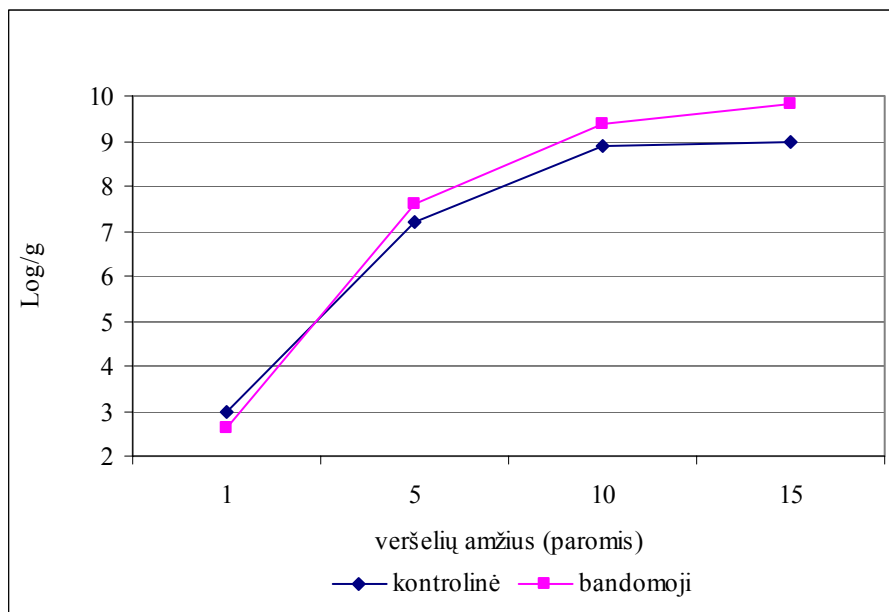
Bifidobakterijų kiekis nustatytas storame Blauroko terpės sluoksnyje mėginius užsėjant giluminiu būdu į mėgintuvėlio dugną (Баникова и др., 1987). Mėgintuvėliai inkubuoti 37°C temperatūroje 48 val. Koliforminių bakterijų kiekis nustatytas lėkštelių metodu sėjant ant terpių paviršiaus. Panaudotos terpės – Levino

agaras („Merck“, Vokietija) ir MacConkey agaras („Liofilchem“, Italija). Lėkštelės inkubuotos aerobinėmis sąlygomis 37°C temperatūroje 48 val. Mieliniai grybai nustatyti lėkštelių metodu sėjant ant Sabūro agaro paviršiaus („Sifin“, Vokietija). Lėkštelės inkubuotos aerobinėmis sąlygomis 30°C temperatūroje 48 val. Atliekant pirminį bakterijų identifikavimą paruošti mikroskopiniai preparatai dažyti Gramo metodu, morfologija įvertinta mikroskopu. Tyrimų rezultatai apdoroti statistinės analizės metodu (Juozaitienė, Kerzienė, 2001). Duomenys pateikti logaritmine išraiška.

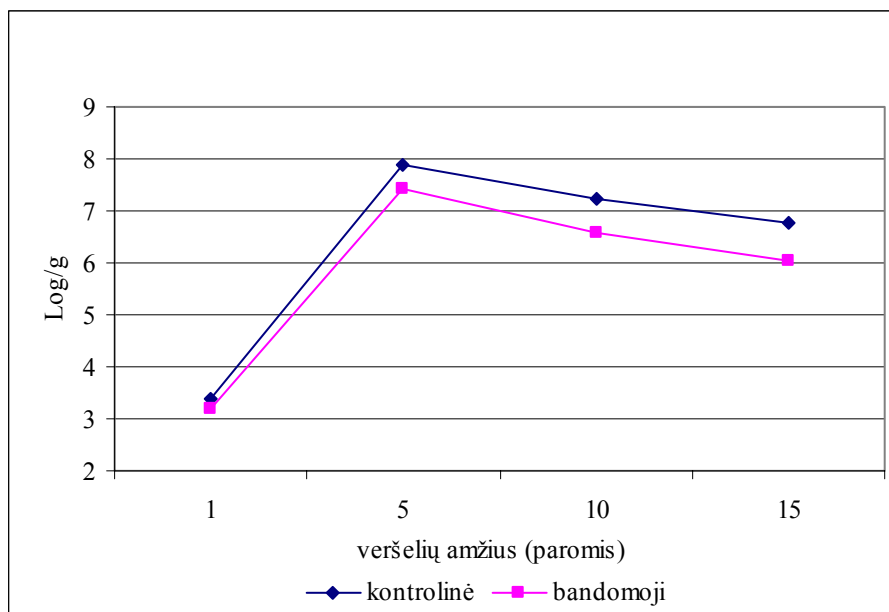
Tyrimų rezultatai. Pirmą parą veršelių fekalijose, tiek bandomojoje, tiek kontrolinėje grupėse bifidobakterijų kiekis svyravo nuo 2,6 iki 3,0 log/g. Po 5 parų abiejose grupėse jų padaugėjo iki 7,2–7,6 log/g, po 10 parų – iki 8,9–9,4 log/g. 15 parą kontrolinėje grupėje jų nustatyta 9,0±0,18 log/g, bandomojoje grupėje – 9,8±0,19 log/g (p<0,05; 1 pav.).

Pirmą parą veršelių fekalijose koliforminių bakterijų abiejose grupėse buvo 3,2–3,4 log/g, po 5 parų jų padaugėjo iki 7,4–7,9 log/g, po 10 parų abiejose grupėse sumažėjo: bandomojoje – iki 6,6 log/g, kontrolinėje grupėje – iki 7,2 log/g. Po 15 parų šių bakterijų abiejose grupėse sumažėjo – kontrolinėje iki 6,78±0,18 log/g, bandomojoje – iki 6,05±0,16 log/g. Rezultatas statistiškai patikimas (p<0,05) (2 pav.).

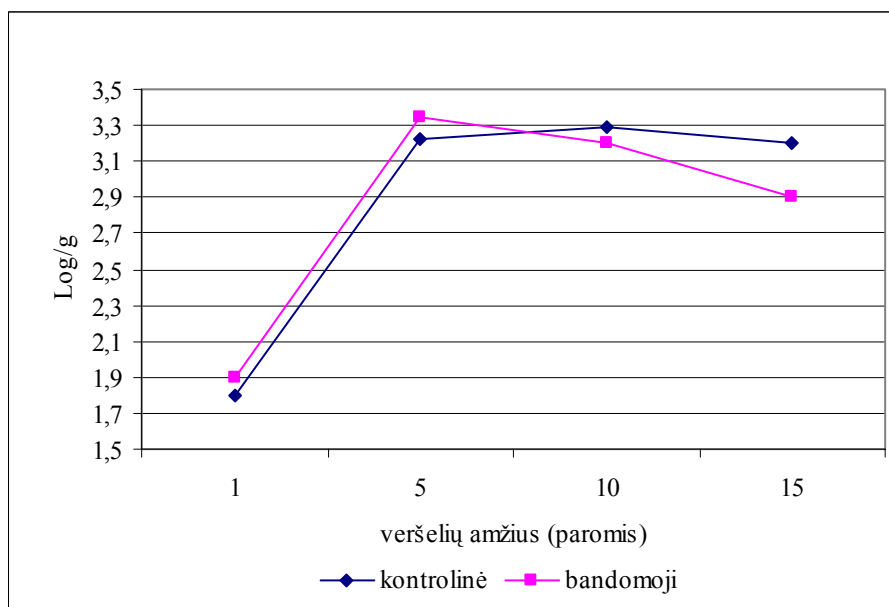
Pirmą parą veršelių fekalijose mielinių grybų tiek bandomojoje, tiek kontrolinėje grupėje buvo nuo 1,8 iki 1,9 log/g, po 5 parų abiejose grupėse jų padaugėjo iki 3,2–3,3 log/g. Toks kiekis išliko iki 10 parų. Po 15 parų bandomojoje grupėje mielinių grybų sumažėjo 0,3 log/g, t. y. kontrolinėje grupėje nustatyta 3,2 log/g, bandomojoje – 2,9 log/g. Statistiškai patikimo skirtumo tarp veršelių grupių nenustatyta (p>0,05) (3 pav.).



1 pav. Bifidobakterijos veršelių fekalijose



2 pav. Koliforminės bakterijos veršelių fekalijose



3 pav. Mieliniai grybai veršelių fekalijose

Aptarimas. Iš tyrimų rezultatų matome, kad pirmomis gyvenimo dienomis, kai sterilus veršelio virškinamasis traktas apgyvendinamas mikroorganizmais, vyksta ryškūs kiekybiniai mikrofloros pokyčiai. Kaip teigia M. A. Sidorovas (2000), veršelių fekalijose bifidobakterijų fiziologinė norma svyruoja nuo 8 iki 12 log/g. Šie naudingi anaerobiniai mikroorganizmai nuo 10 iki 15 amžiaus dienos veršelių virškinamajame trakte sudaro apie 90 proc. visų mikroorganizmų ir saugo šeimininko organizmą nuo patogeninių bakterijų, atlieka pirmo nespecifinio barjero funkciją (Субботин, Сидоров, 2004). Mūsų tyrimo duomenimis, abiejose veršelių grupėse fiziologinės normos ribas bifidobakterijų kiekis pasiekė per 10 parų. Statistiškai patikimai bifidobakterijų

kiekis padidėjo po 15 parų naudojant probiotines laktobacilų padermes. Bifidobakterijų bandomojoje grupėje padaugėjo 8,8 proc.

Veršelių virškinamajame trakte pirmosiomis gyvenimo dienomis vyrauja gramneigiami mikroorganizmai, tarp jų – koliforminės bakterijos – įprasta virškinamojo trakto mikroflora (Сидоров, Субботин, 2000; Кондрахин, 2003; Моргунова и др., 2003). Mūsų tyrimo duomenimis, bandomojoje veršelių grupėje po 15 parų koliforminių bakterijų sumažėjo 10,8 proc. palyginti su kontroline grupe. Mieliniai grybai 5–15 parą atitiko fiziologinę normą, bet svyravo nuo 2,9 iki 3,2 log/g. Toks kiekis yra optimalus virškinamajame trakte anaerobinėms sąlygoms palaikyti (Newbold et al., 1995;

Dawson et al., 1990).

Kadangi probiotiniai mikroorganizmai, sunaudoti profilaktikos ar gydymo tikslais, negali ilgą laiką išlikti virškinamajame trakte, juos gyvulys turi gauti periodiškai. Laktobacilos, sugirdytos du kartus per parą, teigiamai veikė veršelių virškinamojo trakto mikroflorą. Nustatyta, kad, panaudojus probiotines laktobacilų padermes, padaugėjo naudingų anaerobinių bifidobakterijų, sumažėjo koliforminių bakterijų, mielinių grybų. Toks mikrobines populiacijos koregavimas pirmosiomis gyvenimo dienomis padeda sumažinti nepageidaujamos mikrofloros vyravimą virškinamajame trakte, mažina naujagimių veršelių sergamumą (Bengmark, 1998; Каширская, 2000; Тараканов, 2000; Данилевская и др., 2003; Овод, 2003).

Išvados.

1. Nustatyta teigiamas probiotinių laktobacilų padermių *L. plantarum* ir *L. fermentum* poveikis naudingai virškinamojo trakto mikroflorai ankstyvuojant postnataliniu periodu.

2. Laktobacilų padermės stimuliavo bifidobakterijų augimą ($p < 0,05$), pasižymėjo inhibiciniu poveikiu koliforminėms bakterijoms, sumažino jų kiekį ($p < 0,05$), slopino mielinių grybų augimą ($p > 0,05$).

Literatūra

- Bendali F., Bichet H., Schelcher F., Sana M. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet. Res.* 1999. 30:61–74.
- Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998. 42:27.
- Boehm G., Lidestri M., Casetta P., Jelinek J., Negretti F., Stahl B., Marini A. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Archives of disease in childhood. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002 May; Vol. 86 (3), P.78–81.
- Berg R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 1996. 4. P.430-435.
- Brook I., Ledney G. D. *Inf. J. Radiat. Biol.*–1994. V. 33. – P. 63–77.
- Dawson K. A., Newman K. E., Boling J. A. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage – fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 1990. 68:3392.
- Jukna Č., Jukna V., Šimkus A., Laugalis J. Probiotiko *Yeasture* įtaka veršelių augimui, pašaro virškinamumui ir sveikatai. *Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija*, 2003. T. 22 (44). P. 40–43.
- Jukna Č., Jukna V., Šimkus A. Probiotikų ir fitobiotikų įtaka galvijų prieauglio mėsinėms savybėms ir mėsos kokybei. *Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija*, 2005. T. 29 (51). P. 76–79.
- Juozaitytė V., Kerzienė S. Biometrija ir kompiuterinė duomenų analizė. Kaunas, 2001. P. 115.
- Montalto M., Arancio F., Izzi D., Cuoco L., Curigliano V., Manna R., Gasbarrini Probiotics: history, definition requirements and possible therapeutic applications I probiotici: storia, definizione, requisiti e possibili applicazioni terapeutiche. *Annali italiani di medicina interna: organo ufficiale della Societ italiana di medicina interna. [Ann Ital Med Int]* 2002; Vol. 17 (3), P. 157–65.
- Newbold C. J., Wallace R. J., Chen X. B., McIntosh F. M. 1995. Different stais of *saccharomyces cervisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811–1818.
- Stagg J. A., Hart A. L., Knight S. C., Kamm M. A. (2004) Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:255–270.
- Tannock, G. W. 1997 Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Friends Biotechnol.* 15:270–274.
- Vandevoorde L., Christianens and W.Verstraete. In vitro appraisal of the probiotic value of intestinal lactobacilli. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 1991. 7:587–592.
- Oberauskas V., Kantautaitė J., Sutkeviciene R., Sederevicius A., Monkeviciene I., Zelvyte R., Ramanauskiene J., Laugalis J., Kabasinskiene A. Investigations of the properties of probiotic *Lactobacillus plantarum* U-14 and *Lactobacillus fermentum* U-5 strains and their evaluation during the liophilization. *Medycyna Wet.* 2004, 60 (12). P. 1282–1278.
- Oberauskas V., Sutkeviciene R., Kantautaitė J., Sederevicius A. *Lactobacilli plantarum* ir *fermentum* įtaka bendram naujagimių veršelių laktobacilų ir enterobakterijų kiekiui fekalijose. *Veterinarija ir zootechnika. Lietuvos veterinarijos akademija*, 2004. T. 25 (47). P. 25–28.
- Баникова Л. А., Королева Н. С., Семенихина В. Ф. Микробиологические основы молочного производства. Москва. Агропромиздат, 1987. С. 298–299.
- Данилевская Н. В., Субботин В. В., Вашурин О. А. Лактобициол для стимуляции продуктивности дойных коров. *Ветеринария.* №.2. 2003. С. 50–54.
- Каширская Н. Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры. *Русский медицинский журнал.* Москва, 2000. Т. 8. №. 13–14. С.572–576.
- Кондрахин И. П. Диспепсия новорожденных телят-успехи проблемы. *Ветеринария* №.1. 2003. С. 39–43.
- Медицинская микробиология (ред. Покровский В. И., Поздеев О. К.). Москва: ГЭОТАР Медицина, 1999. С. 76.
- Мищенко В. А., Яременко Н. А., Гитманской О. И. Особенности диарейных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария.* №.5. 2001. С. 5–7.
- Моргунова В. И., Алтухов Н. М., Моргнров В. И. Профилактика колибактера у новорожденных поросят. *Ветеринария.* 2003. №. 1. С. 18–21.
- Сидоров М. А., Субботин В. В., Данилевская Н. В. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками. *Ветеринария.* 2000. №.11. С. 17–21.
- Субботин В. В., Сидоров М. М. Основные элементы профилактики желудочно – кишечной патологии новорожденных животных. *Ветеринария.* 2004. №.1. С. 3–6.
- Субботин В. В. Профилактика желудочно – кишечных болезней новорожденных животных с симптомом диареи. *Ветеринария.* 2001. №.4. С. 3–7.
- Тараканов Б. В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору–пищеварительного тракта и организм животных. *Ветеринария.* №.1. 2000. С. 47–55.
- Терехов В. И. Аспекты этиологии диарей новорожденных телят. *Вестн. Ветеринарии.* 1998. №. 11. С. 38–42.
- Овод А. С. Направленное формирование бактериоценоза кишечника. *Ветеринария.* 2003. №.. 2. P. 23–26.