

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Lara MILOŠEVIĆ

**UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH
KRMNIH DODATKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Lara MILOŠEVIĆ

**UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH KRMNIH
DODATKOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ASSESSMENT OF THE SUITABILITY OF PROBIOTIC FEED
ADDITIVES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstva - zootehniko. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorico dr. Bojano Bogovič Matijašič.

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Lara Milošević

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.084/.087(043.2)=163.6
KG	živinoreja/prehrana živali/krmi dodatki/probiotiki/ustreznost/Slovenija
KK	AGRIS Q51
AV	MILOŠEVIĆ, Lara
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (somentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2008
IN	UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI PROBIOTIČNIH KRMNIH DODATKOV
TD	Diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP	XII, 63 str., 29 pregl., 9 sl., 4 pril., 83 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Na slovenskem trgu je vedno več krmnih dodatkov s probiotičnimi bakterijami, ki predstavljajo alternativo antibiotikom, katerih uporaba je za pospeševanje rasti v EU prepovedana. Namen naloge je bil pregledati probiotične krmne dodatke in krmne mešanice, ki so bili naprodaj v Sloveniji leta 2006 in ugotoviti ustreznost podatkov, navedenih na deklaraciji izdelkov ter njihovo ujemanje z ugotovljenimi vrednostmi. Prisotnost deklariranih bakterijskih vrst smo ugotavljali z metodo PCR ali s sekvenciranjem dela 16S rDNA, njihovo število pa s konvencionalno metoda štetja na selektivnih gojiščih. Le pri petih od 18 analiziranih izdelkov smo zasledili podatke o roku uporabnosti. Dva izdelka nista vsebovala podatka o številu bakterij (KE/g), na dveh izdelkih je bilo nejasno navedeno število probiotičnih mikroorganizmov, na enem izdelku pa smo zasledili pomanjkljivo navajanje imen, saj so bili omenjeni samo rodovi (<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> in <i>Enterococcus</i>). V enem izdelku je bila deklarirana vrsta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC1026, ki je ni na seznamu dovoljenih dodatkov za prehrano živali. Glede števila mikroorganizmov so bili v celoti ustrezni le štirje izdelki, od tega trije koncentrirani dodatki, in ena krmna mešanica. Z metodo PCR smo uspešno dokazali prisotnost vrste <i>E. faecium</i> . Prisotnost bakterijskih vrst <i>B. subtilis</i> ali <i>B. licheniformis</i> smo potrjevali s sekvenciranjem dela 16S rDNA, ki pa ni omogočilo razlikovanja med obema vrstama. Potrdili smo predvidevanja, da so na slovenskem trgu probiotični krmni dodatki, ki ne ustrezajo deklaraciji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 636.084/.087(043.2)=163.6
 CX animal husbandry/animal nutrition/feed additives/probiotics/suitability/Slovenia
 CC AGRIS Q51
 AU MILOŠEVIĆ, Lara
 AA ROGELJ, Irena (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co- supervisor)
 PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
 PY 2008
 TI ASSESSMENT OF THE SUITABILITY OF PROBIOTIC FEED ADDITIVES
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XII, 63 p., 29 tab., 9 fig., 4 ann., 83 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB On the market in Slovenia there is an increasing number of feed additives with probiotic bacteria which present an alternative to the antibiotics as growth promoters which are banned in EU. The aim of this study was to examine the probiotic feed additives and feed mixtures available in Slovenia in 2006, and to establish whether the information on the labels are appropriate and in accordance with the results of analysis. The presence of labelled bacterial species was established by PCR or sequencing of the part of 16S rDNA, and the number was determined by the conventional plate counting on selective media. Only five of 18 products analysed were labelled with expiration date. Two products did not contain the data indicating the number of bacteria (cfu/g), on two products the number of probiotic microorganisms was labelled ambiguously, whereas the label of one product did not contain the appropriate names since only the genera (*Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Enterococcus*) were indicated. One product contained *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1026, which is not included on the list of permitted feed additives. Only four fresh products were thoroughly suitable regarding the number of microorganisms, among them three feed additives and one feed mixture. The PCR method proved successful for the verification of the presence of the *E. faecium* species. The presence of *B. subtilis* or *B. licheniformis* was confirmed by sequencing a part of 16S rDNA; however, the distinction between the two species was not possible with the application of this method. The initial hypothesis, anticipating that in Slovenia feed additives are marketed, which do not comply with the declared values on the labels, was confirmed.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 DELOVNA HIPOTEZA IN NAMEN NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DEFINICIJA PROBIOTIKOV SKOZI ČAS	3
2.2 MIKROBIOTA PREBAVIL	4
2.3 RODOVI IN VRSTE BAKTERIJ, KI JIH UPORABLJAMO KOT PROBIOTIKE	6
2.3.1 Mlečnokislinske bakterije	7
2.3.2 Spore vrst rodu <i>Bacillus</i>	8
2.3.3 Kvasovke	9
2.3.3.1 Monogastrične živali	9
2.3.3.2 Prežvekovalci in kopitarji	10
2.4 NAČIN DELOVANJA PROBIOTIKOV	10
2.5 USTREZNOST PROBIOTIČNIH IZDELKOV V EVROPI	13
2.5.1 Varnost uporabe	14
2.5.2 Zahteve po oceni mikrobnega krmnega dodatka	15
2.5.2.1 Študije o učinkovitosti dodatka	15
2.5.2.2 Študije o varnosti uporabe dodatka	15
2.5.2.3 Študije na ciljnih živalskih vrstah	16
2.5.2.3.1 Toksikološke študije dodatka - Tolerančni testi	16
2.5.2.3.2 Preskus mutacij genov pri bakterijah	16
2.5.2.3.3 Preskus kromosomskih odstopanj (zaželeno <i>in-vitro</i>).	16
2.5.2.3.4 Produkcija toksinov in virulentnih faktorjev	16
2.5.2.3.5 Antibiotični rezistentni profil in prenosljivost rezistentnosti	17
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 MATERIAL	18

3.1.1	Krmni dodatki	18
3.1.2	Fiziološka raztopina za razredčevanje	20
3.1.2.1	Barvanje po Gramu (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija)	20
3.1.3	Trdna gojišča	20
3.1.3.1	Gojišče Kanamycin Aesculin Azid Agar (KAA)	20
3.1.3.2	Gojišče Aesculin Bile (BA)	20
3.1.3.3	Gojišče Brain heart infusion agar (BHI)	20
3.1.3.4	Gojišče YGC	21
3.1.3.5	Gojišče Rogosa	21
3.1.3.6	Gojišče MRS s klindamicinom (MRS + cly)	21
3.1.3.7	Gojišče LAM VAB brez vankomicina	21
3.1.3.8	Gojišče LAM VAB z vankomicinom (LAM VAB + van)	21
3.1.3.9	Gojišče CATC	21
3.1.4	Tekoče gojišče	22
3.1.4.1	Gojišče M17	22
3.1.5	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	22
3.1.5.1	Reagenti za izolacijo bakterijske DNA iz enterokokov	22
3.1.5.2	Reagenti za agarozno elektroforezo	22
3.2	METODE	22
3.2.1	Ugotavljanje števila mikroorganizmov v krmnih dodatkih	22
3.2.2	Ugotavljanje morfoloških značilnosti mikroorganizmov	24
3.2.3	Izolacija DNA za verižno reakcijo s polimerazo	24
3.2.3.1	Postopek izolacije DNA iz čistih bakterijskih kultur s komercialnim setom za izolacijo genomske DNA (Promega, ZDA)	24
3.2.4	Analiza DNA z metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR)	25
3.2.5	Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrste <i>Enterococcus faecium</i> z metodo PCR	25
3.2.6	Elektroforeza na agaroznem gelu	26
3.2.7	Ugotavljanje zaporedja nukleotidov dela 16S rDNA izolatov rodu <i>Bacillus</i>	26
4	REZULTATI	28
4.1	DEKLARACIJE NA KRMNIH DODATKIH	28
4.2	UGOTAVLJANJE ŠTEVILA IN USTREZNOSTI PROBIOTIKOV, KI SO NAVEDENI NA DEKLARACIJAH KRMNIH DODATKOV	29
4.2.1	BioPlus 2b®	30
4.2.2	S - doj	31
4.2.3	Biosaf	32
4.2.4	Vebac® 50	33
4.2.5	S- bre	34
4.2.6	Sure bio	35
4.2.7	TL- štarter	36
4.2.8	PU- predštarter	37

4.2.9	PU- štarter	38
4.2.10	IN-Mleko Vit 2, IN-K4 acido, IN-Lactomix 16, IN-K1E, IN-Zuchterfolg	39
4.2.11	IN-F1; IN-Start A35; IN-Lactomil; IN-Start AM50	44
4.2.12	Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrst <i>Enterococcus faecium</i> in <i>Bacillus licheniformis</i> ali <i>Bacillus subtilis</i>, deklariranih na izdelkih, z vrstno specifično reakcijo PCR in s sekvenciranjem variabilne regije V1/V2 gena za 16S rRNA	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1	RAZPRAVA	53
5.1.1	Deklaracije izdelkov	53
5.1.2	Število probiotičnih mikroorganizmov v izdelkih	54
5.2	SKLEPI	58
6	POVZETEK	59
7	VIRI	60
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki jih uporabljajo kot probiotike (Shah, 2000; Young, 1998)	7
Preglednica 2: Krmni dodatki, naprodaj v Sloveniji, v prvi polovici leta 2006	18
Preglednica 3: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za ugotavljanje števila mikroorganizmov	23
Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice enega vzorca (25 µl) za reakcijo PCR	25
Preglednica 5: Parametri reakcije PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrste <i>Enterococcus faecium</i>	25
Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice enega vzorca (70 µl) za reakcijo PCR	26
Preglednica 7: Parametri reakcije PCR za pomnoževanje regije V1/V2 gena za 16S rRNA	27
Preglednica 8: Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku BioPlus 2B®	30
Preglednica 9: Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku S - doj	31
Preglednica 10: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih mikroorganizmov v izdelku Biosaf	32
Preglednica 11: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v izdelku Vebac® 50	33
Preglednica 12: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v izdelku S- bre	34
Preglednica 13: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in kvasovk v izdelku Sure bio	35
Preglednica 14: Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku TL- štarter	36
Preglednica 15: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih kvasovk v izdelku PU-predštarter	37
Preglednica 16: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih kvasovk v izdelku PU-štarter	38
Preglednica 17: Deklaracija in gojišče za ugotavljanje števila probiotičnih bakterij in spor v izdelkih IN–Mleko Vit 2, IN–K4 acido, IN–Lactomix 16, IN–K1E, IN–Zuchterfolg	39
Preglednica 18: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN–Mleko Vit 2	40
Preglednica 19: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN–K4 acido	40
Preglednica 20: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN– Lactomix 16	41
Preglednica 21: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN–K1E	42
Preglednica 22: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN– Zuchterfolg	43

Preglednica 23:	Deklaracija in gojišče za ugotavljanje prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelkih IN–F1, IN–Start A35, IN–Lactomil, IN–Start AM50	44
Preglednica 24:	Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN–F1	44
Preglednica 25:	Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN–Start A35	45
Preglednica 26:	Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN–Lactomil	46
Preglednica 27:	Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN–Start AM50	46
Preglednica 28:	Rezultati ugotavljanja prisotnosti DNA deklariranih vrst bakterij iz čistih bakterijskih kultur, osamljenih iz izdelkov	48
Preglednica 29:	Število deklariranih mikroorganizmov v 18 krmnih dodatkih ali mešanicah ob prejemu vzorca in ob izteku roka uporabnosti oz. po šestih mesecih skladiščenja	54

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Kolonizacija različnih delov črevesa z mikroorganizmi (Gedek, 1991)	5
Slika 2: <i>Enterococcus faecium</i> na gojišču KAA (foto: L. Milošević, 2006)	8
Slika 3: <i>Bacillus licheniformis</i> in <i>Bacillus subtilis</i> na gojišču BHI (foto: L. Milošević, 2006)	9
Slika 4: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na agarški plošči (foto: L. Milošević, 2006)	9
Slika 5: Mikrobiološke interakcije v črevesju (Stewart in sod., 1995).	12
Slika 6: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto <i>Enterococcus faecium</i> , na DNA pridobljeni iz kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih	49
Slika 7: Število spor <i>Bacillus</i> v svežih izdelkih in ob koncu roka uporabnosti oz. po šestih mesecih od prejema vzorcev.	50
Slika 8: Število bakterij rodu <i>Enterococcus</i> v svežih izdelkih in ob koncu roka uporabnosti oz. po šestih mesecih od prejema vzorcev	51
Slika 9: Število deklariranih kvasovk vrste <i>Sacharomyces cerevisiae</i> v izdelku in ugotovljenih ob prejemu vzorca ter ob koncu roka uporabnosti	52

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku Mleko Vit 2 - prvi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*
- Priloga A2: Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku Mleko Vit 2 - drugi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*
- Priloga B1: Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku S-doj - prvi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*
- Priloga B2: Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku S-doj - drugi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AB	Gojišče Aesculin Bile
ATCC	American type culture collection (ameriška zbirka mikroorganizmov)
B.	Bacillus
BHI	Gojišče Brain Heart Infusion
Bif.	Bifidobacterium
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
bp	Bazni par
CATC	Gojišče Citrate Azide Tween Carbonate
CFU	Colony Forming Unit
Chr. Hansen	Podjetje Christian Hansen, Danska
cly	Klindamicin
DFM	Direct-fed microbials (krmni dodatki, ki vsebujejo žive mikroorganizme, ki blagodejno vplivajo na žival)
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
rDNA	Ribosomska deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Mešanica nukleotidov
E. coli	Escherichia coli
E. faecium	Enterococcus faecium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FEEDAP	Panel on additives and products or substances used in animal feed
GoTaq® Flexi	Komplet kemikalij, ki vsebuje pufer za polimerazo brez MgCl ₂ , polimerazo, izolirano iz mikroorganizma <i>Thermus Aquaticus</i> , ter založno raztopino MgCl ₂
GoTaq®	Komplet kemikalij, ki vsebuje pufer za polimerazo s 7,5 mM MgCl ₂ ter polimerazo, izolirano iz mikroorganizma <i>Thermus Aquaticus</i>
G+	Po Gramu pozitivne bakterije
ILSI	International Life Science Institute
CAA	gojišče Kanamycin Aesculin Azid
KE	Kolonijske enote
LAMVAB	Gojišče za laktobacile z vankomicinom
L.	Lactobacillus
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
MO	Mikroorganizmi
MRS	Gojišče de Man - Rogosa - Sharp
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction (verižna reakcija s polimerazo)
RNA	Ribonukleinska kislina
rRNA	Ribosomska ribonukleinska kislina
rDNA	Gen za ribosomsko ribonukleinsko kislino
SCAN	Scientific Committee for Animal Nutrition (Znanstveni odbor za prehrano živali)
SCCA	Short Chain Carboxylic Acids (kratkoverižne karboksilne kisline)
TAE	Tris acetatni pufer

TTC	Indikator 2,3,5 - trifeniltetrazolijev klorid
van	Vankomicin
WHO	World Health Organization

1 UVOD

Probiotični izdelki so razširjeni v prehrani ljudi in živali. V zadnjem desetletju so postali razširjeni tudi v humani in v veterinarski medicini in hkrati pritegnili velik komercialni interes. V veterinarski medicini bodo probiotiki postali najverjetneje še zanimivejši, saj so se v raziskavah izkazali kot možni terapevtiki in pospeševalci rasti. Za vzpodbujanje rasti farmskih živali so v preteklosti množično uporabljali antibiotike. Zaradi povečevanja rezistence bakterij proti antibiotikom je Evropska Unija njihovo uporabo v neterapevtske namene leta 2006 prepovedala.

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki dokazano ugodno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini. Poleg tega so probiotični izdelki, kot varni proizvodi brez stranskih učinkov, zelo priporočljivi. V državah Evropske unije so mikroorganizmi, ki jih uporabljajo v živalski prehrani, predvsem bakterijski sevi po Gramu pozitivnih bakterij, ki pripadajo rodovom *Bacillus* (*Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*), *Enterococcus* (*Enterococcus faecium*), *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), *Pediococcus* (*Pediococcus acidilactici*) ter *Streptococcus* (*Streptococcus infantarius*); Njihova naloga je predvsem preprečevanje motenj ravnotežja v črevesju, z zatiranjem naselitve neželenih mikroorganizmov in spodbujanjem imunskega sistema (Lata in sod., 2005).

Na slovenskem trgu je vedno več živil ter prehranskih dopolnil, dodatkov živalski krmi in zdravil brez recepta, ki vsebujejo probiotične bakterije. Trditve o njihovih zdravilnih učinkih in sestavi niso preverjane na enak način in z enako strogostjo, kot je uveljavljeno za zdravila, zato mikrobiološke analize velikokrat pokažejo neujemanje med številom in vrsto dejansko prisotnih organizmov v izdelku ter podatki na deklaraciji (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2006).

Štetje na trdnih gojiščih je najpogosteje uporabljena metoda ugotavljanja vsebnosti živih probiotikov. Ta metoda se uporablja predvsem za ugotavljanje števila mikroorganizmov v tekočinah in v materialih, ki jih je mogoče homogenizirati v tekočini. Rezultat izražamo kot število KE (kolonijskih enot) v millilitru ali v gramu vzorca, pri čemer se je potrebno zavedati, da lahko kolonije izrastejo iz več kot ene mikrobne celice (Kaiser, 2005).

Dolgotrajnost klasičnih metod ugotavljanja bakterij v živilih je glavni povod za razvoj novih, hitrejših metod. Pri uvajanju alternativnih metod je pomembno, da poleg hitrejših izvedbe, visoke občutljivosti in specifičnosti metode, upoštevamo še možnost avtomatizacije metode, neodvisnost izvedbe metode glede na vrsto živila, ceno, enostavno izvedbo, dostopnost potrebnih kemikalij ter možnost standardizacije metode (Mothershed in Whitney, 2005). Te zahteve teoretično dobro izpolnjujejo metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR). S pomočjo te reakcije lahko izjemno majhne količine iskanega fragmenta DNA pomnožujemo tako dolgo, da dobimo dovolj produkta za zaznavo. Verižna reakcija s polimerazo je metoda, ki omogoča kopiranje

odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraza. Lahko rečemo, da s to metodo kloniramo DNA, ne da bi za to potrebovali žive celice, to pa pred odkritjem PCR praktično ni bilo mogoče.

1.1 DELOVNA HIPOTEZA IN NAMEN NALOGE

Zanimanje za probiotične krmne dodatke na slovenskem trgu narašča. Področje probiotičnih živil in krme še ni temu primerno zakonsko regulirano. Proizvajalcem ni potrebno dokazovati, da vrsta in število živih mikroorganizmov, označenih na deklaraciji, dejansko ustreza stanju. Razviti pa bo potrebno tudi primerne metode za kontrolo tovrstnih izdelkov ter zasledovanje probiotičnih mikroorganizmov v prehranski verigi, z modernimi molekularno-biološkimi tehnikami. Predvidevali smo, da so tudi na slovenskem trgu izdelki, ki ne ustrezajo deklaraciji.

Namen te diplomske naloge je bil pregledati probiotike v krmnih dodatkih in ugotoviti, če se podatki, navedeni na deklaraciji izdelkov, ujemajo z vrsto in številom bakterij v gramu izdelka, če je število bakterij pred iztekom roka uporabnosti zadostno za pričakovani učinek izdelka, skratka ugotoviti kakovost in ustreznost probiotičnih izdelkov za živali na slovenskem trgu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DEFINICIJA PROBIOTIKOV SKOZI ČAS

Izraz “probiotik” je izpeljan iz grškega izraza »pro bios« in pomeni “za življenje” (Anonymous, 2001).

Bakterije in kvasovke so človeku že od nekdaj v veliko pomoč. Predvsem mlečnokislinske bakterije so prisotne pri postopku siliranja, kisanju zelja in pri pripravi mlečnih izdelkov kot so jogurt, skuta, kefir. Kvasovke, večinoma vrste *Saccharomyces cerevisiae*, uporabljajo pri proizvodnji kruha, piva in vina (Probiotics ..., 2005).

Začetek raziskav o probiotikih sega v začetek 20. stoletja, ko je ruski biolog Elie Metchnikoff ugotovil blagodejne učinke bakterij, ki povzročajo fermentacijo mlečnih izdelkov. Vse do leta 1960, ko so bili ponovno odkriti kot dodatek k humani in živalski prehrani, ni bilo večjega zanimanja za probiotike. Prvi učinkovit izdelek za živalsko prehrano, ki je zadostil pogojem za krmne dodatke, se je pojavil na evropskem trgu šele sredi osemdesetih let prejšnjega stoletja (Probiotics ..., 2005).

Probiotiki so bili prvič opisani kot »substance, ki jih izloči en mikroorganizem in spodbujajo rast drugega mikroorganizma« (Lilly in Stillwell, 1965).

Fuller je leta 1989 definirala probiotike kot »prehranski dodatki z živimi organizmi, ki z izboljšanjem črevesnega mikrobiološkega ravnovesja ugodno vplivajo na živalskega gostitelja« (Fuller, 1989).

Definicija probiotikov je bila dolgo omejena zgolj na živalsko prehrano, zato sta Havenaar in Huis in't Veld (1992) predlagala razširitev definicije tudi na humano prehrano. Njuna definicija se glasi: »Probiotik je mono- ali mešana kultura živih mikroorganizmov, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z uravnavanjem črevesne mikroflore«.

Delovna skupina, ki deluje v okviru organizacije ILSI (International Life Science Institute) Europe je definirala probiotike kot »prehranski dodatki z živimi mikroorganizmi, ki ugodno vplivajo na zdravje gostitelja« (Salminen in sod., 1998). Iz istega leta izhaja definicija, ki pravi, da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki dokazano ugodno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini (Guarner in Schaafsma, 1998).

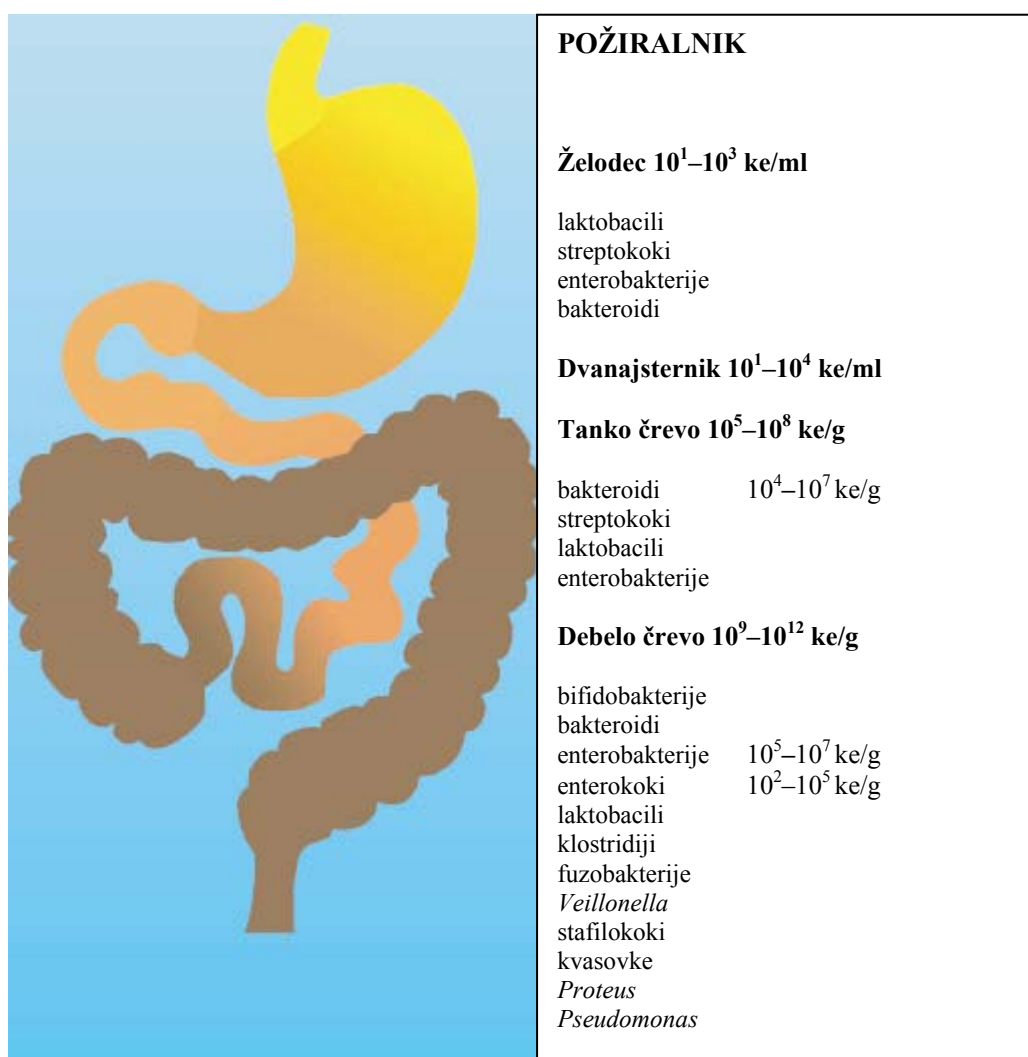
Definicija, ki so jo povzele tudi FAO in WHO, opisuje probiotike kot »žive mikroorganizme, ki imajo ugodne učinke na zdravje gostitelja, če jih zaužije v zadostni količini« (FAO/WHO, 2002).

2.2 MIKROBIOTA PREBAVIL

Človek in živali se rodijo s sterilnim prebavnim traktom, ki ga kaj kmalu naseli pestra populacija mikroorganizmov (Fonty in sod., 1995). Z mikrobi najbolj naseljena predela sta debelo črevo pri neprežvekovalcih in predželodec pri prežvekovalcih. Črevesna mikroflora je vključena v prebavo, hkrati pa ima lokalni vpliv tudi na imunski sistem. Črevesje je tako največji telesni organ, ki poleg absorpcije hranilnih snovi, varuje telo pred vdorom patogenih mikrobov.

Prebavni trakt je bogato okolje za razvoj in vzdrževanje goste in raznovrstne mikrobne flore. V vampu in debelem črevesu človeka ter monogastričnih živali se nahaja od 10^{10} - 10^{11} , predvsem anaerobnih bakterij na gram vsebine (Fonty in sod., 1995).

Mikroflora vsebine želodca monogastričnih živali (prašičev, perutnine,...) je relativno maloštevilčna ($10^1 - 10^3$ KE/g) in ima manj pomembno vlogo pri prebavnih procesih. Za razliko od želodčne mikroflore se črevesna mikroflora monogastričnih živali in prežvekovalcev po sestavi in delovanju komajda razlikuje. Tako število kot raznovrstnost mikroorganizmov od tankega črevesa do slepega črevesa narašča. Glede na spremembo življenjskih pogojev za mikroorganizme (vsebnost kisika, hranilnih snovi in vode v prebavilih ter vrednosti pH) od dvanajsternika do debelega črevesa, se spreminjata tudi koncentracija in sestava mikroorganizmov. V osrednjem delu tankega črevesa je koncentracija kisika majhna. Razmerje med anaerobnimi in aerobnimi mikrobi se od dvanajsternika do debelega črevesa poveča. Poleg avtohtone flore gastrointestinalnega trakta - bakterij, ki so stalno naseljene (npr. mlečnokislinske bakterije), poznamo še prehodno floro. Prehodna flora ne naseli črevesne sluznice temveč se konstantno pomika vzdolž prebavnega trakta in se na koncu izloči z blatom (Probiotics ..., 2005).



Slika 1: Kolonizacija različnih delov črevesa z mikroorganizmi (Gedek, 1991)

V vampu prežvekovalcev živijo tri vrste organizmov, ki skrbijo za razgradnjo celičnih struktur do kratkoverižnih karboksilnih kislin, ki so kot vir energije dostopne živali gostiteljici. Največ je bakterij - 10^{11} KE/ml vampnega soka, praživali je 10^6 KE/ml vampnega soka, gliv pa 10^3-10^4 /ml vampnega soka (Russell, 2002).

Idealne razmere v gastrointestinalnem traktu privedejo do stanja imenovanega evbioza, ki pomeni dobro sožitje med mikroorganizmi. Mikroorganizmi in živalski gostitelj pa živijo v simbiozi. Omenjeno stanje nastopi, ko glavna, satelitska in stranska flora dosežejo razmerje $>90:1:0,001$. Stanju, v katerem je to razmerje resno moteno, pravimo disbioza in pomeni slabo sožitje (Probiotics ..., 2005).

Pri monogastričnih živalih sestavljajo glavno floro predvsem anaerobne bakterije, klostridiji, bifidobakterije, laktobacili, bakteroidi, evbakterije. Ti proizvajajo mlečno kislino in druge kratkoverižne karboksilne kisline. Satelitska flora je sestavljena predvsem iz enterokokov in *E. coli*. Stransko floro sestavljajo pretežno škodljive

bakterije kot so vrste *Proteus*, stafilokoki in *Pseudomonas*. Metanogene bakterije so prisotne pri številnih monogastričnih živalih (prašičih, konjih,...) in pri 50 % človeške populacije (Marteau in sod., 2001; Harmsen in sod., 2002).

Pri prežvekovalcih predstavljajo glavno floro vrste, ki so zmožne razgradnje vlaknin (Fonty in sod., 1995). Metanogene bakterije, prisotne v vampu, so bistvene za zagotovitev dobrega delovanja ekosistema. Pri proizvodnji metana uporabljajo ogljikov dioksid in vodo, ki se tvorita tekom fermentacije. V vampu se nahajajo tudi glive, ki so večinoma vključene v razgradnjo celuloze (Fonty in Joblin, 1991). Migetalkarji, glavna skupina praživali, so zmožni razgradnje mnogih substratov (rastlinske polimere, proteine, topne komponente) in uravnavanja mikrobiološkega ravnotežja, s požiranjem bakterij in gliv (Jouany in sod., 1995).

Žival gostiteljica omogoča prebavni mikroflori življenjske pogoje s konstantno temperaturo, oskrbo s hranilnimi snovmi, uravnavo vrednosti pH in odstranitvijo metabolitov. V zameno ji le-ta v stanju evbioze pomaga pri pomembnih procesih, kot so prebava hranil in razstrupljanje toksičnih molekul, sinteza vitaminov B in K, ustvarjanje učinka pregrade pred nezaželenimi mikrobi, zaščita črevesne sluznice pred vdorom mikrobov, ter dozorevanje in spodbujanje imunskega sistema gostitelja (Probiotics ..., 2005).

Motnje dinamičnega ravnovesja gastrointestinalne mikroflore so posledica številnih zunanjih dejavnikov: neuravnovežene prehrane, nizkokakovostne prehrane, neustrezne prehranske higijene. Podobno prizadanejo mikroorganizme tudi prebavni sokovi in protitelesa živali gostiteljice. Stres vpliva v veliki meri na izločanje prebavnih sokov in vrsto ter jakost peristaltike. Dejavniki, ki v živinoreji povzročajo stres, so predvsem brejost, rojstvo, odstavljanje, transport, prerivanje živali, neustrezna vhljevanje in bolezni. Še preden se pojavijo znaki neravnovesja, je le-to lahko že prisotno v prebavnem traktu in utegne močno zmanjšati konverzijo krme, povzroči nezadostno rast, slabo telesno kondicijo, diarejo in podobne težave (Tajima in sod., 2000).

2.3 RODOVI IN VRSTE BAKTERIJ, KI JIH UPORABLJAMO KOT PROBIOTIKE

Probiotike, ki jih uporabljamo v prehrani živali, delimo na tri skupine:

- mlečnokislinske bakterije,
- spore vrst *Bacillus*,
- kvasovke.

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki jih uporabljajo kot probiotike (Shah, 2000; Young, 1998)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Druge mlečnokislinske bakterije	Ostali
<i>L. acidophilus</i>	<i>Bif. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus</i> spp.
<i>L. brevis</i>	<i>Bif. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. casei</i>	<i>Bif. bifidum</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>Bif. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>Bif. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Bif. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>Bif. thermophilum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gallinarum</i>		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
<i>L. gasseri</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

2.3.1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije že vrsto let uporabljajo pri proizvodnji fermentiranih mlečnih izdelkov in silaže. Nekatere vrste so običajne predstavnice človeške in živalske mikroflore. Mlečnokislinske bakterije s fermentacijo pretvorijo različne sladkorje v mlečno kislino. Najpomembnejši rodovi mlečnokislinskih bakterij, ki so v rabi kot probiotiki, so *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Enterococcus*. Predstavnice rodu *Bifidobacterium*, ki so prav tako pogoste v prebavilih, taksonomsko ne sodijo med mlečnokislinske bakterije, čeprav jih pogosto povezujejo z njimi, saj naseljujejo iste ekološke niše (Probiotics ..., 2005).

Enterococcus faecium je najbolj pomembna vrsta, ki se uporablja v živalski prehrani. Razlog za to je predvsem v robustnosti in razširjenosti te vrste (Probiotics ..., 2005). Bakterijska rodova *Lactobacillus* in *Enterococcus* sta prisotna v velikih količinah, $10^7/10^8$ in $10^5/10^6$ KE/g črevesne vsebine živali (Anadón in sod., 2006).



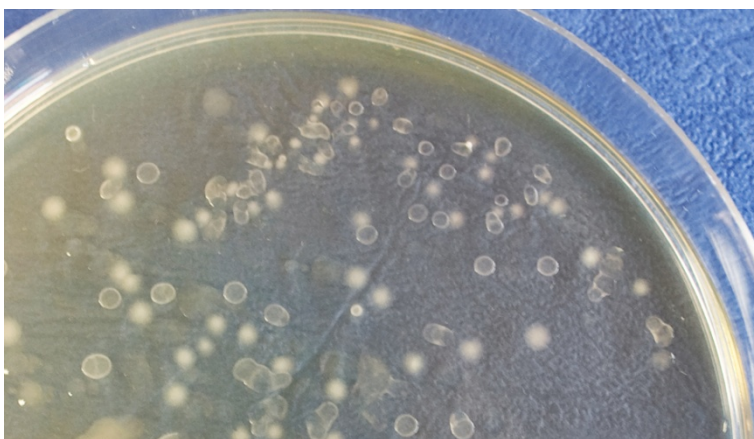
Slika 2: *Enterococcus faecium* na gojišču KAA (foto: L. Milošević, 2006)

Značilna odlika probiotikov, ki proizvajajo mlečno kislino, je tudi njihova sposobnost naselitve in zaščite črevesne sluznice, ter metabolična aktivnost v črevesu, ki vključuje tudi sproščanje protimikrobnih snovi. S poskusi *in vitro* ter *in vivo* so uspeli pojasniti nekatere mehanizme delovanja mlečnokislinskih bakterij (Servin, 2004):

- produkcija protimikrobnih snovi, kot so SCCA, izključevanje vezave potencialno patogenih mikroorganizmov na črevesno sluznico,
- zaviranje produkcije toksinov,
- stimulacija lokalnega črevesnega imunskega sistema,
- vpliv na fizikalno-kemijske pogoje v črevesu in s tem omejitev rasti pogojev za neželjene mikrobo,
- vpliv na metabolizem žolčnih kislin in posledično pospeševanje absorpcije maščob,
- učinek na črevesni epitel,
- večja zmožnost absorpcije.

2.3.2 Spore vrst rodu *Bacillus*

Rod *Bacillus* obsega številne vrste paličastih, po Gramu pozitivnih bakterij, ki jih največ najdemo v prsti. Nekatere seve te heterogene skupine zaradi ugodnih funkcionalnih učinkov uporabljajo v živalski prehrani (Alexopoulos in sod., 2004; Adami in Cavazzoni, 1999; Duc in sod., 2004; Hoa in sod., 2001; Jadamus in sod., 2002; Jørgensen in Kürti, 2004).



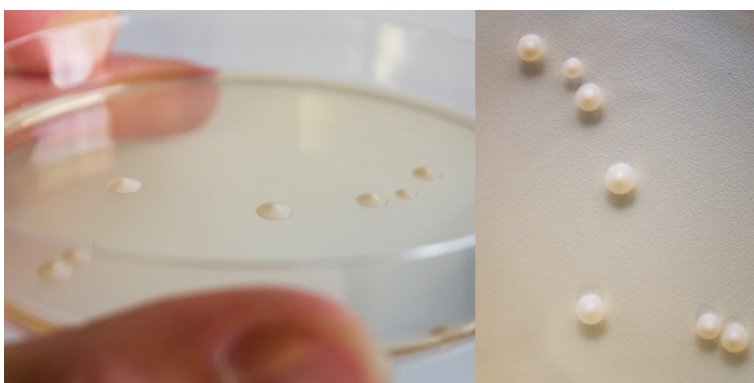
Slika 3: *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis* na gojišču BHI (foto: L. Milošević, 2006)

Naravna zmožnost probiotikov iz rodu *Bacillus* je tvorba spor, ki so zelo odporne proti zunanji vplivom. Sposobnost mikroorganizmov za življenje je tako ohranjena, kar je ključno za njihov učinek. Ko spore vrst *Bacillus* s prehrano pridejo v prebavila, lahko tam tudi vzkalijo v vegetativne celice, vendar se običajno ne razmnožujejo v veliki meri. Uvrščamo jih v prehodno floro, ki ne naseli črevesa. Kot eksogeno vnešeni mikroorganizmi imajo probiotiki rodu *Bacillus* visok potencial za stimulacijo lokalne črevesne imunosti. Razmnoževanje bakterij rodu *Bacillus* z delitvijo celic poteka le v prisotnosti hranil, vode in ustrezne temperature. Potekati mora v začetnem delu prebavnega trakta, le tako lahko pričakujemo pozitivne učinke v tistih delih črevesa, v katerih poteka absorpcija hranil (Sanders in sod., 2003).

2.3.3 Kvasovke

2.3.3.1 Monogastrične živali

Rod *Saccharomyces* vključuje štiri različne vrste. *Saccharomyces cerevisiae* je zelo razširjena vrsta, vendar se le nekaj sevov uporablja v živalski prehrani.



Slika 4: *Saccharomyces cerevisiae* na agarški plošči (foto: L. Milošević, 2006)

Vpliv kvasovk na črevesno delovanje se kaže v:

- nevtralizaciji določenih bakterijskih toksinov (Castagliuolo in sod., 1999)
- vezavi bičkastih bakterij zaradi prisotnosti receptorjev manoze - patogeni mikroorganizmi se tako izločijo z blatom, kar omogoča porast ugodne flore (Czerucka in Rampal, 2002),
- okrepitvi sluznice in črevesnih celic, kar privede do izboljšanja presnove hranil,
- prilagajanju imunskega sistema s stimulacijo odziva na patogene bakterije, ki se kaže kot produkcija IgA (Qamar in sod., 2001).

Vsi ti učinki, ki ugodno vplivajo na črevesje, posledično izboljšajo rast monogastričnih živali.

2.3.3.2 Prežvekovalci in kopitarji

Študije kažejo, da so kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* po zaužitju hrane v vampu in tankem črevesu metabolično aktivne, vendar se njihovo število v zadnjih delih črevesa zmanjšuje (Chaucheyras-Durand in sod., 1998; Dawson in sod., 1990).

Zelo pomembna je zmnožnost potrošnje kisika živih kvasovk, kar je še posebej pomembno za ekosistem vampa (Newbold in sod., 1995; Dawson in Hopkins, 1991). Potrošnja kisika ustvari bolj ugodne pogoje za rast in delovanje vampnih anaerobnih mikroorganizmov (Chaucheyras-Durand in Fonty, 2002; El Hassan in sod., 1993). Pospešeno je tudi celulolitično delovanje, ki je ključnega pomena za razgradnjo celuloze (Chaucheyras-Durand in Fonty, 2001, 2002).

S povečanim celulolitičnim delovanjem se v vampu poveča tudi prebavljivost krme, še posebej tiste, bogate z vlakninami. Pri konjih probiotični pripravki, ki vsebujejo kvasovke, običajno v obliki kvasa, prav tako prispevajo k povečanju prebavljivosti neprebavljenih vlaknin v slepem črevesu (Medina in sod., 2002).

Kvasovke so zmožne regulirati vrednost pH vampa in omejiti tveganje za acidozo s pomočjo vzajemnega delovanja z bakterijami, ki proizvajajo in izkoriščajo laktat (Chaucheyras-Durand in sod., 1996; Michalet-Doreau in Morand, 1996; Girard in sod., 1993; Girard in Dawson, 1994).

2.4 NAČIN DELOVANJA PROBIOTIKOV

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki zaužiti v zadostnem številu pozitivno vplivajo na sestavo črevesne mikroflore. Preprečujejo motnje ravnotežja v prebavilih z zaviranjem naselitve neželenih mikroorganizmov v črevesju. Potemtakem mora doseči probiotični sev črevo živ in v zadostnem številu. Probiotik mora preživeti proces priprave krme, ki vključuje peletiranje pri visoki temperaturi, ter preživeti večtedensko skladiščenje. Prav tako mora preživeti prehod skozi neugodne pogoje prebavil, predvsem v želodcu, kjer je vrednost pH zelo nizka. Daleč najbolj stabilni probiotiki so spore *Bacillus*, ki so odporne proti visokim temperaturam in preživijo dolgoročno skladiščenje. Naprimer, 95 % spor

Bacillus cereus toyoi je preživel peletiranje pri temperaturi 87 °C, 92 % pa še osem tednov skladiščenja (Ortwin, 2005). Vegetativne, dehidrirane bakterijske celice so veliko bolj občutljive za toplotno obdelavo in hranjenje. Pri vrsti *Enterococcus faecium* je naprimer inaktivacija med osemtedenskim skladiščenjem kar 50 - odstotna (Ortwin, 2005). Proizvajalci običajno rešujejo izgubljanje živosti mikroorganizmov v izdelkih tako, da jih dodajo v precej večjem številu.

Probiotiki izpodrivajo kemične pospeševalce rasti za domače živali, predvsem odkar v državah EU uporaba antibiotikov v te namene ni več dovoljena. Ker so običajni mikroorganizmi prebavnega trakta ljudi in živali, ne predstavljajo dodatnega tveganja v prehranski verigi (Fuller, 1999).

Probiotike za živali uvrščajo v skupino mikrobnih krmnih dodatkov, ali tako imenovanih »direct-fed microbials« (DFM). Poleg zaviranja razvoja neželenih organizmov, navajajo med funkcionalnimi učinki tudi preprečevanje nastajanja toksičnih komponent, kot so amini in amoniak, ki povzročata dražljaje v prebavnem traktu in zavirata imunske funkcije. Z dodajanjem DFM se izboljšuje izkoristek krme, zmanjšuje pogostost bolezni in zmanjšuje stres pri živalih. Potencialne koristi dodajanja probiotikov v krmo lahko strnimo v sledeče (Fuller, 1999):

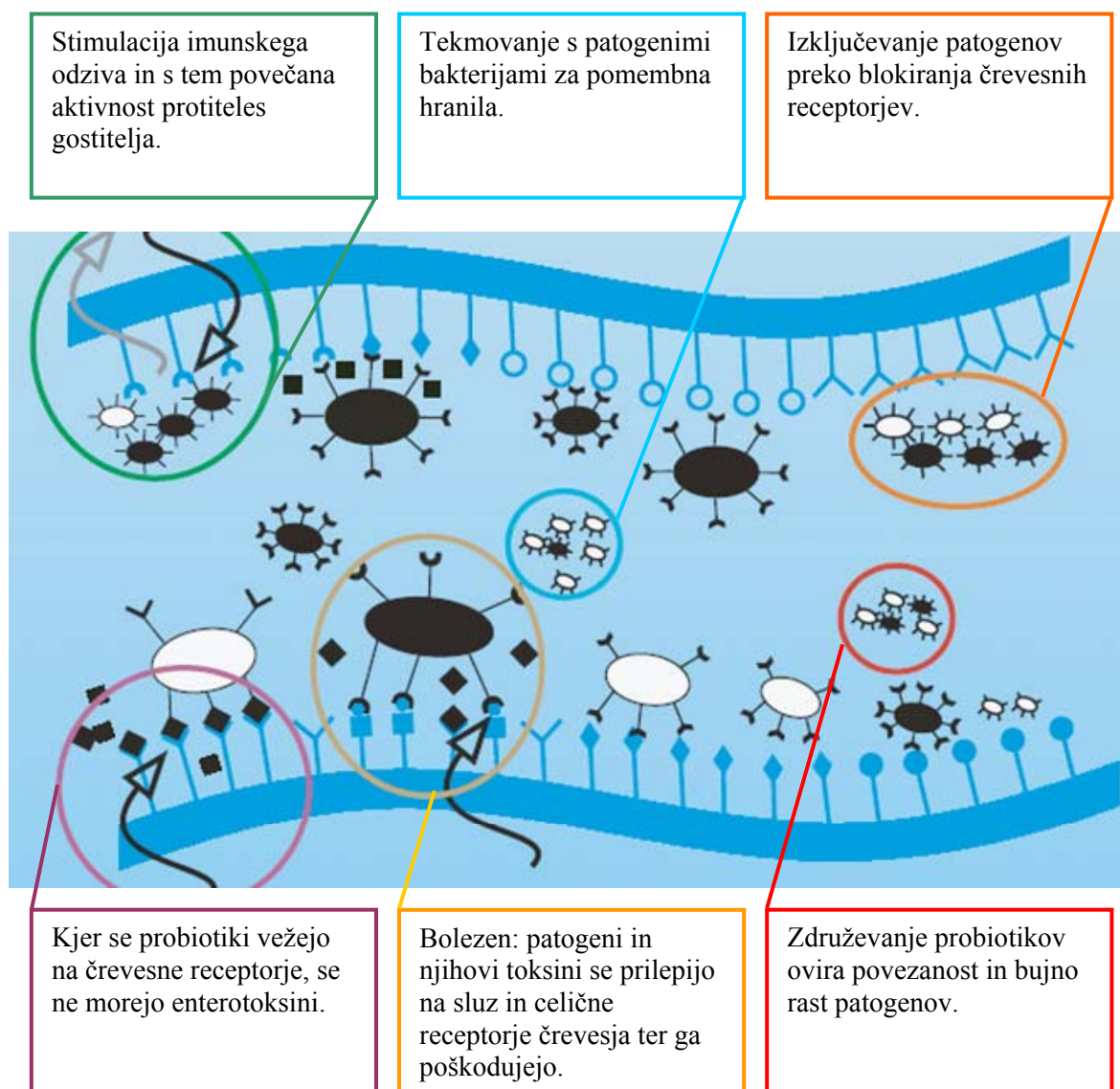
- povečana stopnja rasti,
- izboljšana konverzija krme,
- boljši izkoristek krme,
- izboljšana presnova,
- boljša absorpcija hranil,
- boljša odpornost proti infekcijskim boleznim,
- izboljšana proizvodnja in kvaliteta jajc,
- večja mlečnost in kvaliteta mleka.

Rezultati vpliva probiotikov na živali včasih variirajo, vendar se moramo zavedati različnih pogojev in razlik med živalmi. Probiotični pripravki lahko vsebujejo zelo različne seve mikroorganizmov, ki se po delovanju razlikujejo. Dejavniki, ki prav tako lahko vplivajo na variabilnost rezultatov, vključujejo razvojno stopnjo živali, način vnosa, dozo in higienske okoliščine vhlavitve. Velja pa, da pri ustreznih pogojih in s pravilno izbiro pripravkov, probiotiki predstavljajo učinkovit krmni dodatek za domače živali (Fuller, 1999).

Nedavne raziskave v različnih državah so pokazale, da so nekatere probiotične bakterije zmožne stimulirati imunski sistem na dva načina (Fuller, 2005):

- žive bakterijske celice in njihovi metaboliti vplivajo na črevesno steno, ali pa
- se absorbirajo antigeni, sproščeni iz mrtvih bakterij, ki neposredno stimulirajo imunski sistem.

Pozitivni učinek probiotikov, ki temelji na metabolični aktivnosti, obsega neposredne in posredne učinke, ki so prikazani na sliki 5.



Slika 5: Mikrobiološke interakcije v črevesju (Stewart in sod., 1995).

Probiotične bakterije, kot so laktobacili, streptokoki, enterokoki, bacili in *E. coli*, se uspešno uporabljajo pri reji perutnine, prašičereji in reji telet, medtem ko so se glivični probiotiki, kot so vrste rodov *Saccharomyces* in *Aspergillus*, uveljavili predvsem na področju reje goveda (Fuller, 1999).

Pri teletih se največja učinkovitost dodajanja probiotikov kaže takoj po rojstvu, ob odstavitvi in prehodu na krmljenje iz vedra, pred in po transportu živali, po prekomerni prehranjenosti in zdravljenju z antibiotiki. Pri govedu se največje prednosti dodajanja kažejo pri primerih ketoze in ostalih presnovnih motnjah, po antibiotičnem zdravljenju, ali po težki telitvi. Pri pujskih je učinkovitost največja takoj po rojstvu, ob slabotnosti, ob

kastriranju in prirezovanju repov, prebavnih težavah ter pri odstavitvi. Pri prašičih se vpliv kaže pri antibiotičnih zdravljenjih, ob prasiatvi in pred transportiranjem živali (Fuller, 1999).

Diareja je glavni problem pujskov v prvih tednih po odstavitvi, zato veliko raziskujejo vpliv probiotikov na zmanjšanje pojavnosti in težavnost diareje. Objavljeni podatki na tem področju kažejo v 80 % poskusov znaten upad diareje pri pujskih, ki prejemajo probiotike. Tak učinek so dosegli z različnimi vrstami mikroorganizmov. V treh neodvisnih študijah s pujski (dve z *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, ena z *Bacillus cereus toyoi*) so tako zabeležili znatno zmanjšanje pojava diareje, vendar nobenih pomembnih vplivov na razvoj živali (Ortwin, 2005).

Vrsta preskusov *in vitro* je pokazala, da oralno vnešeni laktobacili (*L. acidophilus* in *L. casei*) zvišujejo aktivnost makrofagov. Določeni sevi *L. casei* lahko povečajo produkcijo IgA v črevesu in vplivajo na preprečevanje črevesnih infekcij. Predstavniki vrste *L. acidophilus* pa so lahko učinkoviti pri sprožanju produkcije črevesnih protiteles (Fuller, 2005). Mikroorganizme vrst *L. casei* in *L. acidophilus*, posamezne ali mešanico, so Perdigon in sod. (1988) testirali za stimulacijo fagocitske aktivnosti na miših. Ugotovljeno je bilo, da je mešanica veliko bolj učinkovita od posamičnih sevov, kar nakazuje, da se pozitivni učinki sevov lahko dopolnjujejo.

Uporaba predstavnikov *Lactobacillus* je še posebej dobrodošla pri pujskih takoj po prasiatvi, ko so zaradi še nerazvitega imunskega sistema povsem odvisni od protiteles matere. Uporaba probiotikov v sesnem obdobju pri pujskih in teletih vzpodbudno vpliva na razvoj imunskega sistema in tako poveča možnosti za preživetje šoka ob zgodnji odstavitvi (Fuller, 2005).

Probiotiki se pri domačih živalih, kot so prašiči, govedo in kokoši, vse bolj uporabljajo. Eksperimentalno delo je usmerjeno v izboljšanje poznavanja delovanja probiotikov ter optimalnih pogojev za njihov učinek, kakor tudi v razvoj izdelkov z boljšo obstojnostjo.

2.5 KRITERIJI ZA PROBIOTIČNE KRMNE DODATKE V EVROPI

Probiotiki so ena izmed alternativ antibiotikom, ki so jih zaradi bojazni, da bi njihova raba v vlogi krmnih dodatkov prispevala k večjemu številu rezistentnih bakterij proti antibiotikom, v državah Evropske Unije (EU) prepovedali uporabljati kot krmne dodatke, od 1.1.2006 (Ortwin, 2005).

V evropskih državah so mikroorganizmi, ki se uporabljajo v živalski prehrani, predvsem bakterijski sevi po Gramu pozitivnih bakterij, ki pripadajo predstavnikom rodov *Bacillus* (*Bacillus cereus* var. *toyoi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*), *Enterococcus* (*Enterococcus faecium*), *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), *Pediococcus* (*Pediococcus acidilactici*), *Streptococcus* (*Streptococcus infantarius*). Drugi dovoljeni probiotiki so glive, kot so sevi kvasovk vrst *Saccharomyces cerevisiae* in *Kluyveromyces* (Anadón in sod., 2006).

2.5.1 Varnost uporabe

V EU je regulativa uporabe probiotikov za živali veliko bolj urejena kot regulativa uporabe probiotikov za ljudi. Uredba št. 1831/2003 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 22. septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali (Regulation No. 1831/2003), uvršča probiotične mikroorganizme v kategorijo krmnih dodatkov, znotraj te pa v funkcionalno skupino stabilizatorjev črevesne flore. V EU je trenutno na seznamu registriranih probiotikov za krmila 31 sevov mikroorganizmov (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2008).

UREDBA EVROPSKEGA PARLAMENTA IN SVETA (ES) št. 1831/2003 z dne 22. septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali (Regulation No. 1831/2003) vsebuje uredbo o Pogojih za dovoljenje (člen 5), ki pravi, da krmni dodatek ne sme: škodljivo vplivati na zdravje živali in ljudi ali na okolje; biti predstavljen na način, ki bi lahko uporabnika zavedel; škoditi potrošniku z zmanjševanjem razločevalnih lastnosti živalskih proizvodov ali zavajati potrošnika glede razločevalnih lastnosti živalskih proizvodov.

Krmni dodatek mora: ugodno vplivati na lastnosti krme, živalskih proizvodov, na barvo okrasnih ribic in ptic, izpolnjevati prehranske potrebe živali, ugodno vplivati na okoljske posledice reje živali, ugodno vplivati na rejo, prirejo ali dobro počutje živali, zlasti z vplivom na želodčno - črevesno floro ali prebavljivost krme, ali imeti kokcidiostatičen ali histomonostatičen učinek. Antibiotiki, razen kokcidistatov ali sredstev proti histomoniozi, niso dovoljeni kot krmni dodatki (Regulation No. 1831/2003).

V členu 6 so opisane kategorije krmnih dodatkov. Krmni dodatek se, odvisno od funkcije ali lastnosti, razporedi v eno ali več kategorij:

- tehnološki dodatki: katera koli snov, ki se s tehnološkim namenom doda krmi;
- senzorični dodatki: katera koli snov, katere dodajanje krmi izboljša ali spremeni organoleptične lastnosti krme ali vizualne lastnosti hrane, pridobljene iz živali;
- nutritivni dodatki;
- zootehnični dodatki: kateri koli dodatek, uporabljen zato, da ugodno vpliva na prirejo zdravih živali ali na okolje;
- kokcidiostatiki in sredstva proti histomoniozi.

Evropski parlament in Svet EU sta sprejela tudi uredbo za Označevanje in pakiranje krmnih dodatkov in premiksov (člen 16). Za vsak dodatek, ki ga vsebujejo krmila, morajo biti navedeni naslednji podatki:

- posebno ime, dano dodatkom ob dovoljenju, pred katerim stoji ime funkcionalne skupine, kakor je navedena v dovoljenju;
- ime ali naziv podjetja in naslov ali registrirani sedež poslovanja osebe, odgovorne za podatke iz tega člena;
- neto masa ali pri tekočih dodatkih in premiksah neto volumen ali neto masa;
- kadar je primerno, številka odobritve, dodeljena obratu ali posredniku v skladu s členom 5 Direktive 95/69/ES ali številka registracije, dodeljena obratu ali posredniku v skladu s členom 10 navedene direktive (Direktiva št. 95/69/ES);

- navodila za uporabo in priporočila za varno uporabo ter, kadar je ustrezno, posebne zahteve, navedene v dovoljenju, vključno z vrstami živali in kategorijami, ki jim je dodatek ali premiks namenjen;
- identifikacijska številka;
- referenčna številka serije in datum proizvodnje.

Komisija Evropske skupnosti je sprejela direktivo 95/11/ES z dne 4. maja 1995 s spremembo priloge k Direktivi Sveta 87/153/EGS o določitvi smernic za oceno dodatkov v prehrani živali (Direktiva št. 95/11/ES). Za mikroorganizme je predpisano, da mora biti sev shranjen v priznani zbirki kultur, po možnosti v eni izmed zbirk države EU. Sev mora biti oštevilčen in vsebovati podatke o genetski spremembi ter vse ustrezne lastnosti potrebne za identifikacijo. Poleg teh mora imeti še podatke o številu enot, ki tvorijo kolonije (CFU) na gram, o izvoru, morfoloških in fizioloških lastnostih, o stopnjah razvoja, o ustreznih dejavnikih, ki morda vplivajo na njegovo biološko aktivnost (kot dodatek) in drugih genetskih podatkih za identifikacijo.

2.5.2 Ugotavljanje karakteristik mikrobnega krmnega dodatka

2.5.2.1 Študije učinkovitosti dodatka

Študije učinkovitosti probiotičnih sevov morajo biti opravljene na ciljnih živalskih vrstah. Mikrobiološki produkti morajo pozitivno vplivati na izkoristek in konverzijo krme, pogostost bolezni in umrljivost naj bi se zmanjšali, poleg tega naj bi imeli potrošniki večjo korist zaradi boljše kakovosti proizvoda. Prikaz teh učinkov naj temelji na opravljenih treh študijah, s statistično značilnimi rezultati ($P < 0,05$). Študije naj za ciljno živalsko skupino potekajo na vsaj dveh različnih lokacijah. Proučevane kategorije obsegajo: pujske (doječe, odstavljenе), prašiče pitance, svinje (za reprodukcijo in potrebe pujskov), perutnino (reja kokoši in piščancev za jajca in meso), purane (reja za meso in pasemske namene), teleta (reja za meso), živino za meso, krave mlekarice (za proizvodnjo mleka in za reprodukcijo), jagnjeta (reja za meso), ovce (za proizvodnjo mleka in reprodukcijo), koze (za proizvodnjo mleka in reprodukcijo), zajce (za meso). Varnost krmnih dodatkov za uporabnika, potrošnika, žival in okolje, ki so preučevani pod pogoji kmetije, mora biti podprta s tehtnimi znanstveni dokazi (Anadón in sod., 2006).

2.5.2.2 Študije o varnosti uporabe dodatka

Medtem, ko je večina bakterij, ki se uporabljajo kot probiotiki, varnih, so lahko določeni predstavniki problematični. Takšni so na primer enterokoki, ki hitro postanejo odporni proti antibiotikom, poleg tega pa lahko rezistenco prenašajo na druge bakterije. Med problematične uvrščamo tudi predstavnike vrste *B. cereus*, ker lahko proizvajajo različne toksine (Anadón in sod., 2006).

Uredba št. 1831/2003 (Regulation No. 1831/2003) določa za mikrobnе krmne dodatke, da je potrebno zagotoviti, da niso škodljivi za živali.

Študije naj bi omogočile oceno:

- varnosti uporabe dodatka v ciljnih živalskih vrstah,

- tveganj zaradi vdihavanja ali drugih stikov dodatka s sluznico, očmi ali kožo pri osebah, ki so izpostavljene dodatku pri vključevanju v premikse ali popolno krmno mešanico ali vodo,
- tveganj za potrošnika, ki lahko nastanejo kot posledica zaužitja hrane, ki vsebuje ostanke dodatka ali njegove metabolite,
- nevarnosti onesnaženja ali zadrževanja v okolju zaradi dodatka samega ali zaradi stranskih produktov, ki izvirajo iz dodatka ali skozi živalske izločke,
- morebitnih nevarnosti za neciljne živalske vrste.

2.5.2.3 Študije na ciljnih živalskih vrstah

2.5.2.3.1 Toksikološke študije dodatka - Tolerančni testi

Za vsako kategorijo živali je potrebno opraviti preskus tolerance na ciljni živalski vrsti, da se določi varnostni faktor. Namen takega testa je vrednotenje tveganja, ki bi nastalo zaradi naključnega predoziranja med prehranjevanjem. V poskusu, ki naj traja en mesec pri mladih ter tri mesece pri odraslih živalih, so živali tretirane z 10 kratno priporočeno dozo testiranega dodatka. Pri poskusnih živalih se redno spremljajo vidni dokazi o kliničnih učinkih, učinkovitost, kakovost proizvoda in rutinske biokemične preiskave krvi ter drugi parametri, ki so povezani z biološkimi lastnostmi dodatka. Če je proizvod toleranten le v količini, ki je manjša od desetkratnega največjega priporočenega odmerka, se meja varnosti krmnega dodatka lahko izračuna (Anadón in sod., 2006).

2.5.2.3.2 Preskus mutacij genov pri bakterijah

Za identifikacijo aktivnih učinkovin, njihovih presnovkov ali proizvodov z mutagenimi lastnostmi, opravimo kombinacijo preskusov mutagenosti, ki temeljijo na različnih mehanizmih genetskih sprememb. Preskuse izvedemo z aktivacijo presnove sesalcev in brez nje (Regulation No. 1831/2003).

2.5.2.3.3 Preskus kromosomskih odstopanj (zaželeno *in-vitro*)

Toksikološke preskuse opravimo z učinkovino (probiotikom) pred dodajanjem nosilnih snovi, razredčil ali drugih snovi, v skladu z uveljavljenimi mednarodnimi smernicami. Pri preskusih *in-vitro* pride zaradi učinkov beljakovinske narave preparata in encimske aktivnosti pogosto do odstopanj, ki so z ustrezno razlago sprejemljiva. Sistem preskusov nam omogoča, da odkrijemo nespecifične toksične reakcije in genotoksične učinke (Regulation No. 1831/2003).

2.5.2.3.4 Produkcija toksinov in virulentnih faktorjev

Za posamezne predstavnike nekaterih vrst *Bacillus* je dokazano, da lahko pod določenimi pogoji proizvajajo toksine. Organizacija SCAN (European Commission, 2000) je na podlagi pregleda izsledkov raziskav s področja genetike in biokemije toksinov predlagala, da se v prihodnje zaradi varnosti rabe prepreči dodajanje predstavnikov vrste *B. cereus* v živalsko prehrano (Anadón in sod., 2006).

2.5.2.3.5 Antibiotični rezistentni profil in prenosljivost rezistence

Bakterije lahko nosijo prenosljive genske determinante za rezistenco proti antibiotikom. Nekateri sevi enterokokov so pokazali rezistenco proti antibiotiku vancomycinu in zmožnost prenosa tovrstne rezistence na druge bakterijske vrste (Anadón in sod., 2006). Za vse probiotične seve, ki so namenjeni za uporabo kot dodatki, se opravi preskus odpornosti proti antibiotikom, ki se uporabljajo v medicini in veterinarstvu. Kadar se odpornost odkrije, se določita genska osnova te odpornosti in verjetnost prenosa odpornosti na druge organizme v črevesni flori. (Regulation No. 1831/2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Krmni dodatki

Vzorci krmnih dodatkov s probiotiki smo dobili od večjih proizvajalcev in iz mešalnic, ki mešajo krmo za farme. Izdelke smo analizirali takoj po prejemu in tik pred iztekom roka uporabnosti. Medtem so bili shranjeni v suhem prostoru, pri sobni temperaturi. Zanimala nas je sprememba števila probiotikov v vzorcih med skladiščenjem.

Preglednica 2: Krmni dodatki, naprodaj v Sloveniji, v prvi polovici leta 2006

Ime izdelka	Proizvajalec	Deklarirani mikroorganizmi, deklarirana koncentracija	Rok trajanja
1. Koncentrat BioPlus 2B	Proizvajalec Chr. Hansen, Danska; distributer Lek d.d., Ljubljana	$>1,6 \times 10^9$ KE/g <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, $> 1,6 \times 10^9$ KE/g <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750	Od 01.2005 do 07.2006
2. S – doj- Ihan- briketi	Jata Emona d.d., Ljubljana	0,5 g BioPlus 2B/kg, $0,8 \times 10^6$ KE/g <i>Bacillus licheniformis</i> , $0,8 \times 10^6$ KE/g <i>Bacillus subtilis</i>	/
3. Koncentrat Biosaf	Société Industrielle LESAFFRE, Francija	1×10^{10} KE/g <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC Sc 47, National Collection of Yeast Culture, Velika Britanija)	/
4. Koncentrat Vebac	Proizvajalec Medipharm AB, Švedska; distributer Krka d.d., Novo mesto	5×10^{10} KE/g <i>Enterococcus faecium</i> M 74 (NCIMB 11181)	/
5. S – bre- KK- moka	KG RAKIČAN Jata Emona d.d., Ljubljana	20 mg Vebac/kg, 1×10^6 KE/g <i>Enterococcus faecium</i> M 74	/
6. Sure bio	Dodson & Horrell Ltd	$3,33 \times 10^6$ KE/g <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC1026, 1×10^9 KE/g <i>Lactobacilli</i> spp, 1×10^9 KE/g <i>Enterococci</i> spp, 1×10^9 KE/g <i>Pediococci</i> spp	24.04.2007
7. TL - štarter	TMK Maribor	BioPlus 2B	07.04.2006
8. PU - predštarter	Perutnina Ptuj	4×10^9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC Sc 47)	24.03.2006
9. PU - štarter	Perutnina Ptuj	4×10^9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC Sc 47)	29.03.2006

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime izdelka	Proizvajalec	Deklarirani mikroorganizmi, deklarirana koncentracija	Rok trajanja
10. IN – Mleko Vit 2	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1); 1x10 ⁹ KE/kg <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	/
11. IN – K 4 acido	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1); 1x10 ⁹ KE/kg <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	/
12. IN – Lactomix 16	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1); 1x10 ⁹ KE/kg <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	/
13. IN – K1E	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1); 1x10 ⁹ KE/kg <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	/
14. IN - Zuchterfolg	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1); 1x10 ⁹ KE/kg <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	/
15. IN – F1	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1)	/
16. IN – Start A 35	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1)	/
17. IN - Lactomil	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1)	/

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime izdelka	Proizvajalec	Deklarirani mikroorganizmi, deklarirana koncentracija	Rok trajanja
18. IN – Start AM 50	Inntaler, Nemčija	BioPlus 2B, 1,4x10 ⁹ KE/kg <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1)	/

3.1.2 Fiziološka raztopina za razredčevanje

Fiziološko raztopino smo pripravili tako, da smo po navodilih proizvajalca, na pol litra demineralizirane vode, raztopili eno Ringerjevo tableto (Merck, Darmstadt, Nemčija). Raztopino smo razdelili po 9 ml v epruvete in avtoklavirali 15 minut pri 120 °C.

3.1.2.1 Barvanje po Gramu (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija)

Mikroskopski preparat smo barvali z reagenti:

- kristal vijolično,
- lugol,
- mešanica etanola in acetona (1 : 1) in
- barvilo safranin.

3.1.3 Trdna gojišča

3.1.3.1 Gojišče Kanamycin Aesculin Azid Agar (KAA)

Trdno hranljivo gojišče Kanamycin aesculin azid agar (KAA) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Razdelili smo ga v stekleničke (po 250 ml gojišča) in ga avtoklavirali 15 minut pri 120 °C. KAA je selektiven za enterokoke, ki se obarvajo črno. Uporabili smo ga za ugotavljanje števila kolonijskih enot *Enterococcus faecium*.

3.1.3.2 Gojišče Aesculin Bile (AB)

Bujon Aesculin Bile Broth smo pripravili po navodilih proizvajalca (Biolife s.r.l., Milano, Italija) ter pred avtoklaviranjem dodali 15 g/l agar-agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija), da smo dobili trdno hranljivo gojišče. Gojišče AB smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot *Enterococcus faecium*.

3.1.3.3 Gojišče Brain heart infusion agar (BHI)

Tekoče gojišče BHI smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), za agar BHI pa smo pred avtoklaviranjem dodali še 15 g/l agar agarja (Merck,

Darmstadt, Nemčija). Gojišče smo uporabili za štetje kolonijskih enot vrst *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis*.

3.1.3.4 Gojišče YGC

Agar YGC s kvasnim ekstraktom, glukozo in kloramfenikolom za kvasovke smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in ga uporabili za štetje kolonijskih enot kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.3.5 Gojišče Rogosa

Agar Rogosa smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Pred razlivanjem na plošče (45 °C) smo mu dodali 0,26 ml glacialne oetne kisline na 200 ml gojišča. Uporabili smo ga za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktobacilov in pediokokov.

3.1.3.6 Gojišče MRS s klindamicinom (MRS + cly)

Gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Založno raztopino antibiotika klindamicin smo sterilizirali s filtracijo skozi filter s porami velikosti 0,2 µm ter ga pred razlivanjem na plošče gojišču (ohlajenemu na 45 °C) dodali v koncentraciji 0,1 µg/ml (50 µl 0,02 % založne raztopine/100 ml gojišča). Uporabili smo ga za selektivno štetje laktobacilov vrste *Lactobacillus acidophilus*.

3.1.3.7 Gojišče LAM VAB brez vankomicina

Gojišče LAM VAB smo pripravili iz bujona MRS, ki smo mu dodali barvilo brom-krezol zeleno (0,05 g/l). Pred avtoklaviranjem (15 minut pri 120 °C) smo uravnali vrednost pH na $5,0 \pm 0,1$. Ohlajenemu steriliziranemu gojišču (45 °C) smo dodali cistein hidroklorid (0,5 g/l). Ta agar smo izbrali za ugotavljanje števila pediokokov. Vse sestavine so bile proizvedene v Merck-u (Darmstadt, Nemčija).

3.1.3.8 Gojišče LAM VAB z vankomicinom (LAM VAB + van)

Gojišče LAM VAB smo pripravili, kakor je opisano v poglavju 3.1.3.7, po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Ohlajenemu steriliziranemu gojišču (45 °C) smo dodali še 10 ml/l založne raztopine vankomicina (2 mg/ml v vodi) Merck, Darmstadt, Nemčija), da je bila končna koncentracija 20 mg/l.

3.1.3.9 Gojišče CATC

Agar CATC smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Pred razlivanjem na plošče (pri 45 °C) smo dodali Na-karbonat (20 ml 10 % založne raztopine/l agarja), TTC (10 ml 1 % založne raztopine/l agarja) in Na-azid (4 ml 10 % založne raztopine/l agarja). Gojišče smo izbrali za ugotavljanje števila kolonijskih enot enterokokov, ki se ob prisotnosti TTC-ja obarvajo rdeče.

3.1.4 Tekoče gojišče

3.1.4.1 Gojišče M17

Bujon M17 smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Uporabili smo ga za gojenje izolatov vrste *Enterococcus faecium* iz vzorcev, vključenih v analize s PCR.

3.1.5 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

3.1.5.1 Reagenti za izolacijo bakterijske DNA iz enterokokov

- Komercialni set za izolacijo genomske DNA Wizard (Promega, Madison, WI, ZDA)
- Izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Etanol, 70 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- EDTA, 50 mM, pH = 8 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- Lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)

Reakcijska mešanica za PCR:

- 5 x GoTaq® Flexi pufer za polimerazo (Promega, Madison, WI, ZDA),
- Magnezijev klorid - MgCl₂, 25 mM (Promega, Madison, WI, ZDA),
- dNTP (mešanica nukleotidov za PCR), 10 mM (Boehringer Mannheim, Nemčija),
- Začetnika oligonukleotidov F1 in F2 (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija),
- GoTaq® DNA polimeraza (Promega, Madison, WI, ZDA),
- Deionizirana, mikrofiltrirana in sterilizirana voda (mQ).

3.1.5.2 Kemikalije za agarozno elektroforezo

- Agaroz (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- TAE pufer: pripravili smo založno 50-kratno raztopino iz 242 g Tris baze (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) 57,1 ml ledocetne kisline (Fluka, Buchs, Švica) in 100 ml 0,5M EDTA (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija); pripravljeno raztopino smo pred uporabo razredčili z vodo v razmerju 1:50.
- Etidijev bromid (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- Molekularni označevalec - 100 bp (100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva).

3.2 METODE

3.2.1 Ugotavljanje števila mikroorganizmov v krmnih dodatkih

Aseptično smo odprli vzorec krmnega dodatka, natehtali 10 g in zamešali v 90 ml ¼ Ringerjeve raztopine. Mešanico smo pustili rehidrirati 30 minut. Glede na pričakovano

koncentracijo, odčitano iz deklaracije izdelka, smo iz vzorcev, v sterilnih pogojih, pripravili ustrezne serije 10-kratnih zaporednih razredčitev v fiziološki raztopini. Uporabili smo metodo po Kochu, po kateri naj bi po cepljenju na plošče z gojiščem dobili od 30–300 kolonij. Izvajali smo dve metodi in sicer “spread plate method”, metodo z razmazovanjem in “pour plate method”, metodo z vmešavanjem. Pri prvi metodi smo v mikrobiološki sterilni komori razlili v prazne petrijevke gojišča, ohlajena na 45 °C. Na osušeno površino smo odpipetirali 0,1 mililiter vzorca in ga razmazali po celotni površini. Pri metodi z vmešavanjem pa smo 1 mililiter vzorca prenesli v prazno petrijevko in nanj nanесли raztopljen, na 45 °C ohlajen agar. Vsebinsko smo premešali in pustili, da se strdi (Koch, 1994). Pri tej metodi moramo biti zelo previdni, saj lahko z neustrezno temperaturo gojišča uničimo nekatere mikroorganizme. Pri vseh redčitvah smo vedno naredili tudi ponovitve, da bi minimalizirali možnost napak pri delu.

Pri izdelkih s spori *Bacillus* nas je zanimalo tudi, kakšen je vpliv toplotne obdelave na število mikroorganizmov. Tri vzorce: BioPlus 2B, S-Doj in Biosaf smo toplotno obdelali v vodni kopeli pri 83 °C za 15 minut.

Cepljene plošče s hranljivim gojiščem smo inkubirali pri pogojih, prikazanih v preglednici 3.

Preglednica 3: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za ugotavljanje števila mikroorganizmov

TARČNI MO	POGOJI INKUBACIJE	GOJIŠČE
<i>Bacillus</i>	30 °C, 24 h, aerobno	Brain heart infusion, BHI
kvasovke	27 °C, 5 dni, aerobno	YGC
enterokoki	37 °C, 48 h, aerobno	Kanamycin Esculine Agar, KAA
enterokoki	37 °C, 48 h, aerobno	Aesculin Bile, AB
enterokoki	37 °C, 48 h, aerobno	CATC
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	37 °C, 72 h, anaerobno	MRS + klindamicin
Laktobacili	37 °C, 72 h, anaerobno	Rogosa
Laktobacili (razen <i>Lactobacillus acidophilus</i>)	37 °C, 72 h, anaerobno	LAMVAB+ vankomicin
pediokoki	30 °C, 72 h, aerobno	LAMVAB
pediokoki	30 °C, 72 h, aerobno	Rogosa

Anaerobne pogoje za gojenje mikroorganizmov smo zagotovili z uporabo GENbox sistema (Bio-Mérieux, Marcy-L'Etoile, Francija).

Po končani inkubaciji smo zrasle kolonije prešteli z elektronskim števcem (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Za izračun števila KE/ml ali g izdelka smo uporabili naslednjo formulo (IDF standard 100B, 1991):

$$N = \Sigma c / ((n1 + 0,1 \cdot n2) \cdot d) \quad \dots(1)$$

N KE/ml oz. KE/g

Σc vsota kolonij na vseh ploščah

$n1$ število števni plošč 1. razredčitve

$n2$ število števni plošč 2. razredčitve

d razredčitveni faktor, ki se nanaša na 1. razredčitev

3.2.2 Ugotavljanje morfoloških značilnosti mikroorganizmov

Morfološke značilnosti posameznih mikroorganizmov smo po ustrezni inkubacijski dobi ugotavljali z mikroskopiranjem po Gramu obarvanih preparatov. Najprej smo kolonijo s plošče nanegli na objektno stekelce in jo razmazali v kapljici fiziološke raztopine. Nad ognjem smo jo fiksirali in pričeli s postopkom barvanja. Za barvanje po Gramu smo uporabili komercialni set (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija). Postopek je bil sledeč:

- z barvilom kristal vijolično barvamo 5 minut, spiramo z vodo,
- nanesimo barvilo lugol in barvamo 1 minuto, spiramo z vodo,
- razbarvamo preparat z mešanico etanola in acetona, spiramo z vodo,
- barvilo safranin pustimo 1 minuto in spiramo z vodo,
- preparat osušimo s papirnato brisačo.

Preparat smo si nato pogledali pod mikroskopom (Reichert, Avstrija) pri 1000-kratni povečavi z uporabo imerzijskega olja. Pregledali in opisali smo tudi izgled izraslih kolonij na selektivnih podlogah. Kolonije smo opisali po obliki, velikosti, barvi, površini, prečnem prerezu, ustroju in robu.

3.2.3 Izolacija DNA za verižno reakcijo s polimerazo

3.2.3.1 Postopek izolacije DNA iz čistih bakterijskih kultur s komercialnim setom za izolacijo genske DNA (Promega, ZDA)

Po inkubaciji smo precepili tipične kolonije enterokokov iz selektivnih gojišč v tekoče gojišče M17. Seve *Enterococcus faecium* smo tako namnožili in jih uporabili za izolacijo tarčne DNA za reakcijo PCR. Uporabili smo set za izolacijo genske DNA Wizard, ter sledili navodilom proizvajalca (Promega, ZDA). Modificirali smo le uvodni del, katerega cilj je liziranje bakterijskih celic. Dva ml celične kulture smo centrifugirali pri 16000 g 2 minuti. Odstranili smo supernatant, sediment pa resuspendirali v 600 µl 50 mM EDTA, z dodanim encimom lizocimom (10 mg/ml). Pri 37 °C smo inkubirali 45 minut. Nadaljevali smo po navodilih. Vzorce smo hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.4 Analiza DNA z metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, s katero lahko v kratkem času *in vitro* pomnožimo določen odsek DNA v velikem številu kopij (Poljak in sod., 1994). PCR uporabljajo za dokaz prisotnosti bakterijskega genoma po principu temperaturno programiranih ciklov. En cikel sestoji iz treh stopenj: 1) denaturacija DNA; 2) vezava začetnih oligonukleotidov; 3) pomnoževanje tarčnega odseka s toplotno stabilnim encimom. Na občutljivost PCR vpliva izguba vzorčne DNA med izolacijo, prisotnost tuje DNA ali inhibitorjev PCR v vzorcu in izbira metode pomnoževanja (Herzog- Velikonja in sod., 2001).

3.2.5 Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrste *Enterococcus faecium* z metodo PCR

Postopek PCR smo izvedli z začetnima oligonukleotidoma, ki se imenujeta ddl *E. faecium* F1 in ddl *E. faecium* F2. S postopkom PCR smo v našem primeru preverili šest vzorcev DNA bakterij vrste *Enterococcus faecium*. Vključili smo še pozitivno kontrolo, to je DNA čiste kulture referenčnega seva *E. faecium* in negativno kontrolo – deionizirano vodo. Mikroeprovete s 25 µl reakcijske mešanice (23 µl mešanice reagentov in 2 µl tarčne DNA) smo nato prenesli v aparaturo za PCR (Biorad, ZDA). Reakcijska mešanica za PCR je bila sestavljena tako, kot je prikazano v preglednici 4, parametri reakcije PCR pa so navedeni v preglednici 5.

Preglednica 4: Sestava reakcijske mešanice enega vzorca (25 µl) za reakcijo PCR

Sestavine (založne koncentracije)	Volumen reagenta (µl)
5x GoTaq® Flexi ali GoTaq® pufer za polimerazo	5,000
MgCl ₂ (25 mM)	2,000
dNTP (mešanica dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (10 mM)	0,500
1 µL F1 (100 µM),	0,500
1 µL F2 (100 µM),	0,500
encim Taq polimeraza (5 Uµ/L)	0,125
tarčna DNA	2,000
voda	14,400

Preglednica 5: Parametri reakcije PCR za ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrste *Enterococcus faecium*

Reakcija	Parametri	Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C / 3 min	1
Denaturacija DNA	94 °C / 30 s	30
Prileganje	55 °C / 30 s	
Podaljševanje	72 °C / 30 s	
Zaključek	72 °C / 2 min	1

3.2.6 Elektroforeza na agaroznem gelu

Po končani reakciji smo produkte PCR preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Gelska elektroforeza je standardna metoda za ločevanje, prepoznavanje in čiščenje fragmentov DNA.

1,5 % agarozni gel smo pripravili z raztapljanjem ustrezne količine agaroze v 0,5 x TBE puftru do vrelišča. Mešanico smo ohladili, nato smo jo vlili v kalup, vstavili glavničke in počakali, da se strdi. Iz strjenega gela smo pazljivo odstranili glavničke in ga položili v aparat za elektroforezo z 0,5 x pufrom TAE. V žepke v gelu smo nanесли po 10 μ L pomnožkov reakcije PCR. Elektroforeza je potekala pri napetosti 90 V 40 minut. Pričakovana velikost specifičnih produktov je bila 550 bp. Gel smo po končani elektroforezi obarvali z etidijevim bromidom (0,5 μ g/ml) in ga pregledali pri UV svetlobi ($\lambda = 302$ nm).

3.2.7 Ugotavljanje zaporedja nukleotidov dela 16S rDNA izolatov rodu *Bacillus*

Del 16S rDNA (regiji V1/V2) smo pomnožili s postopkom PCR, pri čemer smo uporabili univerzalna bakterijska začetnika oligonukleotidov, ki so ju opisali Ward in sod. (1998). Začetnika oligonukleotidov, ki smo ju uporabili, se imenujeta Y1 in Y2. Reakcija je potekala v 70 μ L, v dveh paralelkah. Po zaključeni reakciji smo po 10 μ L reakcijske mešanice pregledali z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu, v puftru TAE. Elektroforezo smo vodili pri 90 V. Pričakovana velikost specifičnih produktov je bila 350 bp. Gel smo po elektroforezi barvali z etidijevim bromidom (0,5 μ g/ml) in pregledali pri UV svetlobi ($\lambda = 302$ nm). Parametri reakcije, ki smo jih povzeli po Gueimonde in sod. (2004), so opisani v preglednici 7. Reakcijske epruvetke so vsebovale po 64,4 μ L reakcijske mešanice in po 5,6 μ L vzorca z DNA. Sestava je prikazana v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice enega vzorca (70 μ L) za reakcijo PCR

Sestavine (založne koncentracije)	Volumen reagenta (μ L)
5x GoTaq® pufër za polimerazo (s 7,5 mM MgCl ₂)	14,00
dNTP (mešanica dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (10 mM)	1,40
1 μ L Y1 (100 μ M),	1,40
1 μ L Y2 (100 μ M),	1,40
encim Taq polimeraza (5 U μ /L)	0,35
tarčna DNA	5,60
voda	45,85

Preglednica 7: Parametri reakcije PCR za pomnoževanje regije V1/V2 gena za 16S rRNA

Reakcija	Parametri	Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C / 5 min	1
Denaturacija DNA	94 °C / 45 s	30
Prileganje	56 °C / 1 min	
Podaljševanje	72 °C / 45 s	
Zaključek	72 °C / 10 min	1

DNA smo po elektroforezi izrezali iz gela ter očistili s kitom JETquick Gel Extraction Spin Kit, po navodilih proizvajalca (Genomed, Bad Oeynhausen, Nemčija). Sekvenciranje so opravili v specializiranih laboratorijih Microsynth v Balgachu (Švica). Zaporedja nukleotidov smo primerjali s tistimi, ki so shranjena v genski banki NCBI (National Center for Biotechnology Informations, Rockville Pike, Bethesda, ZDA), s pomočjo programa BLAST (Basic Local Aligment Search Tool), ki je dostopen na medmrežju <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

4 REZULTATI

4.1 DEKLARACIJE NA KRMNIH DODATKIH

Konec leta 2005 smo začeli s poizvedovanjem po krmnih dodatkih, ki vsebujejo probiotike in ugotovili, da med majhnimi ponudniki niso bili razširjeni, v trgovinah s kmetijskim blagom pa pogosto prodajalci niso bili seznanjeni s tovrstnimi izdelki. Probiotične krmne dodatke so uporabljale mešalnice, ki mešajo krmo za farme. Na trgu so bili na voljo koncentrirani krmni dodatki s probiotiki dveh slovenskih proizvajalcev, Lek d.d. in Krka.

Pravilnost imen mikroorganizmov, navedenih na deklaracijah, smo preverili na seznamu priznanih bakterijskih imen, ki je dostopen na spletni strani <http://www.bacterio.cict.fr> (Euzéby, 1997). Ugotovili smo naslednje:

Izdelek Sure bio je imel nepopolne podatke. Na sprednjem delu embalaže smo zasledili le vrsto *Saccharomyces cerevisiae*, na deklaraciji pa so omenjeni tudi: *Enterococcus*, *Lactobacillus* in *Pediococcus*. Slednji so omenjeni le kot rodovi in ne kot vrste/sevi, kar je prav tako pomanjkljivost.

Deklaraciji izdelkov TL-šstarter in Sure bio nista vsebovali podatka o številu mikroorganizmov.

Na izdelkih Pu-predšstarter in Pu-šstarter je bila deklaracija nerazumljiva, ni bilo razvidno, ali je število mikroorganizmov mišljeno na kg ali na 10 kg, kolikor tehta pakiranje.

Pri opisu načina uporabe in delovanja posameznih izdelkov nismo zasledili večjih pomanjkljivosti, smo pa pri nekaterih izdelkih (Vebac, BioPlus 2B in Biosaf) pogrešali opis pričakovanih učinkov krmnih dodatkov.

Za devet mlečnih nadomestkov s probiotiki nemškega podjetja Inntaler navajajo, da dodan probiotični koncentrat BioPlus 2B vpliva na optimalno rast in zdrav razvoj živali ter izboljšuje encimatsko prebavo in normalizira črevesno floro. Izdelki vsebujejo še naslednje informacije: "mlečni izdelki so okusni in visoko prebavljivi, cenovno ugodni in z njimi dosegamo dobre rezultate pri vzreji, vsebujejo kombinacijo kakovostnih mlečnih in rastlinskih beljakovin, visoko prebavljive beljakovine iz soje, pospešujejo razvoj predželodcev telet, imajo prehransko- fiziološko ugodno pH vrednost, vsebujejo citronsko kislino in kalcijev formiat, ki regulirata mikrobiološko poselitev črevesnega trakta, visoko kakovostne maščobe so vir energije- odlična razpršenost maščob v izdelkih, topljivost je zelo dobra in hitra- brez ostankov, zdravje živali in varno vzrejo zagotavlja vsebnost vitaminov in elementov v sledovih, primerni so tudi za avtomate".

Izdelek BioPlus 2B® je predstavljen kot krmni dodatek z mikroorganizmi, ki delujejo probiotično. »Pripravek izboljša ješčnost, izkoriščanje krme in proizvodne lastnosti

živali. V tankem črevesu zmanjša možnost za razvoj škodljivih in gnilobnih bakterij ter tako zmanjšuje pogostost prebavnih motenj. Izbrani sevi so encimatsko aktivni in izboljšajo prebavljivost krme. Bakterije razgrajujejo ogljikove hidrate do mlečne kisline, s tem znižajo pH črevesne vsebine, kar zavirajoče vpliva na patogene mikroorganizme. Uporabo probiotika BioPlus 2B® priporočajo predvsem, ko so živali v stresu, npr. ob odstavitvi, neugodnih klimatskih razmerah, pri prehodu na drugačno krmo, pri preseljevanju živali ipd. BioPlus 2B® zelo priporočajo kot krmni dodatek v vseh vrstah začetnih krmnih mešanic za mlade živali«.

Probiotik Vebac® 50 vsebuje mlečnokislinske bakterije za stabilizacijo črevesne flore živali in se uporablja kot dodatek krmi ali vodi za pitje. Na deklaraciji Vebac® 50 so naslednje informacije o delovanju: »Mlečnokislinske bakterije v zelo kratkem času ustvarijo živo biološko zaščitno plast na črevesni sluznici in s svojimi metaboliti zavirajo rast neželenih in škodljivih bakterij. Mikroorganizmi seva *Enterococcus faecium M 74* proizvajajo mlečno kislino, ki zavira razvoj in tako zmanjšuje število patogenih in fakultativno patogenih mikroorganizmov. Z drugimi metaboliti vplivajo na pospešen razkroj in boljše izkoriščanje hranljivih snovi v črevesju ter posredno na boljše proizvodne rezultate in zdravstveno stanje živali. Številni poskusi so dokazali, da se po dajanju laktobacilov živalim občutno zviša nivo imunoglobulinov«.

Med indikacijami navajajo naslednje:

- stabilizacija črevesne flore pri domačih živalih,
- preprečevanje bakterijskih infekcij prebavil,
- večji prirast in boljši izkoristek krme,
- obnavljanje črevesne flore po zdravljenju z antibiotiki,
- boljše zdravstveno stanje brejih svinj in večje število živorojenih pujskov.

Izdelek Sure-bio je na deklaraciji prikazan kot (direkten prepis z deklaracije): »probiotik nove generacije, ki je namenjen dajanju v času stresa. Vsebuje mana oligosaharide - BioMoss (naravni sestavljeni sladkor), ki blokira vezane obolele predele, ki povzročajo bakterijo, da napade črevesno steno, in na ta način pomaga preprečiti škodljivim bakterijam naselitev v črevesju ter Yea – Sacc vsebuje kvas, ki je nosilec kemičnih procesov, ki zagotavljajo sposobnost za življenje in učinkovitost v debelem črevesju, katero je bilo dokazano in dokumentirano na raznolikih konjih v zadnjih 10-ih letih. Sure-bio je idealen med transportom, težkimi tekmovanji, med in po antibiotikih ali pri nagli spremembi rutine ali prehrane«.

4.2 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA IN USTREZNOSTI PROBIOTIKOV, KI SO NAVEDENI NA DEKLARACIJAH KRMNIH DODATKOV

Vzorci smo analizirali ob prejemu in tik pred iztekom roka uporabnosti. Pri vzorcih, kjer je bila deklaracija neustrezna, ali je prišlo do okužbe, smo analizo ponovili. Pri ustrezni deklaraciji smo prešteli kolonijske enote na posameznih/ustreznih gojiščih, pripravili mikroskopske preparate in si jih ogledali.

4.2.1 BioPlus 2b®

Preglednica 8: Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku BioPlus 2B®

BioPlus 2B®	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
> 1,6 x 10 ⁹ KE/g <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, > 1,6 x 10 ⁹ KE/g <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750	BHI
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 22.12.2005 ob prejemu	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
8,4 x 10 KE/g Toplotno obdelano: 1,15 x 10 ¹⁰ KE/g	2,06 x 10 ⁹ KE/g
OPIS IZRASLIH KOLONIJ	
a. Okrogle, prozorne, s poudarjenim belim do rumenim gladkim robom, gladke, ploske, mazave kolonije premera do 2mm.	
b. Okrogle, bele do rumene barve, dvignjene, mazave, gladke z gladkim robom premera do 3mm.	
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
G+ posamične, dolge paličaste bakterije	
PCR	
Vrsta <i>Bacillus subtilis</i> ali <i>Bacillus licheniformis</i> dokazana s sekvenciranjem.	

- En vzorec izdelka BioPlus 2B® smo toplotno obdelali, da bi tako uničili vegetativne celice. Toplotna obdelava je potekala pri 83 °C za 10 minut. Ugotovili smo, da toplotna obdelava ni imela velikega vpliva na število prešteti kolonij.
- Skupno število KE *Bacillus* se je do drugega vzorčenja, pred iztekom uporabnosti, zmanjšalo za 3x.
- Število mikroorganizmov je ob prvem vzorčenju presešlo deklarirano vrednost KE/g, ob drugem pa smo ugotovili 64 % deklariranega števila.

- Po zunanjem opisu kolonij in po rezultatih barvanja po Gramu, kjer smo dobili G+ posamične, dolge paličaste bakterije, ter po preživetju toplotne obdelave smo sklepali, da so v vzorcu prisotne bakterije rodu *Bacillus*. Vrste prisotnih bakterij s konvencionalnimi mikrobiološkimi metodami nismo mogli potrditi, sekvenciranje pa je pokazalo, da gre za vrsto *Bacillus licheniformis* ali *Bacillus subtilis*.

4.2.2 S - doj

Preglednica 9: Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku S - doj

S - doj	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
0,5 g BioPlus 2B/kg, 0,8 x 10 ⁶ KE/g <i>Bacillus licheniformis</i> , 0,8 x 10 ⁶ KE/g <i>Bacillus subtilis</i>	BHI
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 22.12.2005 ob prejemu	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
1,12 x 10 ⁶ KE/g Termizirano: 5,91 x 10 ⁵ KE/g	1,93 x 10 ⁵ KE/g
OPIS IZRASLIH KOLONIJ	
a. Okrogle, prozorne s poudarjenim belim do rumenim gladkim robom, gladke, ploske, mazave kolonije premera do 2mm.	
b. Okrogle, bele do rumene barve, dvignjene, mazave, gladke z gladkim robom premera do 3mm.	
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
G+ posamične, dolge paličaste bakterije	
PCR	
Vrsta <i>Bacillus subtilis</i> ali <i>Bacillus licheniformis</i> dokazana s sekvenciranjem.	

- V toplotno obdelanih izdelkih smo ugotovili za 47 % manjše število KE/g *Bacillus* kot v toplotno neobdelanih, zato smo sklenili, da izdelkov ne bomo toplotno obdelovali.

- Že pri prvi analizi smo ugotovili za 30 % manjše število spor *Bacillus* od deklariranega. Po skladiščenju je število KE/g *Bacillus* padlo za nekaj več kot eno logaritemsko enoto.
- Sekvenciranje je pokazalo, da gre za vrsto *Bacillus licheniformis* ali *Bacillus subtilis*.

4.2.3 Biosaf

Preglednica 10: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih mikroorganizmov v izdelku Biosaf

Biosaf	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
1 x 10 ¹⁰ KE/g <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC Sc 47, National Collection of Yeast Culture, Velika Britanija)	YGC
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 22.12.2005 ob prejemu	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
2,13 x 10 ¹⁰ KE/g	< 100 KE/g
OPIS IZRASLIH KOLONIJ	
a. Okrogle, bele do rumene barve, gladke z gladkim robom, popkasto dvignjen prečni prerez, mazave kolonije, premera do 1cm.	
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
tipične kvasovke (vidni brsti)	
PCR	
Analiza ni bila opravljena	

- Število kvasovk je bilo ob prejemu vzorca 2 krat večje od deklariranega. Pred iztekom roka uporabe pa je število živih kvasovk padlo pod mejo detekcije 100 KE/g.
- PCR analize nismo opravili. Kolonije so bile po izgledu tipične za vrsto *Saccharomyces cerevisiae*, po Gramu so se obarvale pozitivno, morfologija je bila prav tako tipična za kvasovke.

4.2.4 Vebac® 50

Preglednica 11: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v izdelku Vebac® 50

Vebac® 50	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
5 x 10 ¹⁰ KE/g <i>Enterococcus faecium</i> M 74 (NCIMB 11181)	Kanamycin Esculine (KAA), Aesculin Bile (AB)
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 10.1.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
KAA: 8,5 x 10 ¹⁰ KE/g BA: 9,55 x 10 ¹⁰ KE/g	KAA: 5,09 x 10 ⁹ KE/g
OPIS IZRASLIH KOLONIJ	
a. Okrogle, bele barve, gladke, z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije, premera do 1mm, kolonije obkrožajo črni madeži, ki so značilni za enterokoke.	
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
G+ drobni koki v skupkih	
PCR	
Vrsta <i>Enterococcus faecium</i> dokazana s PCR (Slika 6)	

- Enterokokov je bilo v svežem izdelku približno dvakrat toliko, kot je pisalo na deklaraciji. Na gojišču s kanamicinom in eskulinom (KAA) je bilo ugotovljeno število za 11 % manjše od tistega, ugotovljenega na gojišču z žolčem in eskulinom (AB).
- Število enterokokov je bilo pred iztekom roka uporabe za eno logaritemsko enoto manjše od deklariranega, kar pomeni, da jih je 90 % odmrlo, oziroma izgubilo sposobnost rasti na gojišču.
- Na gojišču KAA so izrasle za enterokoke tipične, črno obarvane kolonije, obarvalo se je tudi področje okrog kolonij. Pod mikroskopom smo videli po Gramu pozitivne, drobne koke v skupkih.
- Vrsto *Enterococcus faecium* smo dokazali s postopkom PCR (Slika 6).

4.2.5 S- bre

Preglednica 12: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v izdelku S- bre

S- bre	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
20 mg Vebac/kg, 1 x 10 ⁶ KE/g <i>Enterococcus faecium</i> M 74	KAA, AB
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 10.1.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
KAA: 6,58x10 ² KE/g BA: 1 x 10 ³ KE/g	KAA: < 100 KE/g AB: < 100 KE/g
OPIS IZRASLIH KOLONIJ	
a. Okrogle, bele barve, gladke z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije premera do 0,5mm, kolonije obkrožajo črni madeži, ki so značilni za enterokoke.	
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
G+ drobni koki v skupkih	
PCR	
Vrsta dokazana s PCR (Slika 6)	

- Enterokokov je bilo že v svežem izdelku za tri logaritemske enote manj, kot je pisalo na deklaraciji, kar pomeni za 1000 – krat premalo. Na gojišču s kanamicinom in eskulinom (KAA) je bilo ugotovljeno število za 34 % manjše od tistega, ugotovljenega na gojišču z žolčem in eskulinom (AB).
- Med hranjenjem se je število enterokokov še zmanjšalo, tako da je ob zadnjem vzorčenju padlo pod mejo detekcije 100 KE/g.
- Z metodo PCR smo dokazali vrsto *Enterococcus faecium* (Slika 6).

4.2.6 Sure bio

Preglednica 13: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in kvasovk v izdelku Sure bio

Sure bio	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
3,33 x 10 ⁶ KE/g <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC1026, 1 x 10 ⁹ KE/g "Enterococci spp", 1 x 10 ⁹ KE/g "Lactobacilli spp", 1 x 10 ⁹ KE/g "Pediococci spp"	YGC, KAA, BA, CATC, MRS + klindamicin, LAMVAB+ vankomicin, Rogosa, LAMVAB
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 17.2.2006	2. 12.5.2006
< 100 KE/g kvasovk, 6,3 x 10 ⁷ KE/g enterokokov < 100 KE/g laktobacilov* 4,8 x 10 ⁷ KE/g pediokokov	< 100 KE/g kvasovk < 100 KE/g enterokokov, laktobacilov in pediokokov
OPIS IZRASLIH KOLONIJ	
a. Kvasovke pri cepljeni razredčitvi niso izrasle na gojišču. b. Enterokoki: Okrogle, temno rdeče, s svetlo rdečim gladkim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 2mm. c. Laktobacili: Okrogle, prosojne do bele barve, rahlo dvignjene, mazave kolonije premera do 1mm. d. Pediokoki: Okrogle, prosojne kolonije, gladke, z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije premera do največ 0,5mm.	
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
<ul style="list-style-type: none"> • Enterokoki: G+ drobni koki v skupkih • Laktobacili: G+ kratke palčke • Pediokoki: G+ večji koki v skupkih 	
PCR	
Vrsta <i>Enterococcus faecium</i> dokazana s PCR (Slika 6)	

* na plošči z razredčitvijo 10⁻² je izraslo manj kot deset kolonij

- Probiotični pripravek Sure bio naj bi vseboval kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* ter predstavnike rodov *Lactobacillus* (na deklaraciji zapisano "Lactobaccilli spp"), *Enterococcus* (na deklaraciji zapisano "Enterococci spp") in *Pediococcus* (na deklaraciji zapisano "Pediococci spp").
- Kvasovke pri najnižji razredčitvi (10^{-2}), ki smo jo cepili na gojišče, niso izrasle.
- Tokrat smo za ugotavljanje števila enterokokov uporabili tri različna gojišča: KAA, AB in CATC. Za ustrezno se je v tem primeru izkazalo le gojišče CATC, na katerem smo v svežem izdelku ugotovili $6,3 \times 10^7$ KE/g, kar je 6,3 % deklariranega števila. Število enterokokov se je po hranjenju do konca roka uporabnosti zmanjšalo pod mejo detekcije. Vrsto *Enterococcus faecium* smo dokazali z metodo PCR (Slika 6).
- Število laktobacilov smo ugotavljali na gojiščih LAMVAB z vankomicinom (za vse vrste laktobacilov, razen *L. acidophilus*), MRS s klindamicinom (za vrsto *L. acidophilus*) ter Rogosa. V vseh treh primerih smo inkubirali pri temperaturi 37 °C 2-3 dni v anaerobnih pogojih.
- Pediokoki se od večine laktobacilov ločijo po temperaturi inkubacije, ki mora biti za pediokoke 30 °C, ter po značilnosti, da so sposobni zrasti tudi v prisotnosti kisika. Uporabili smo gojišči, LAMVAB brez vankomicina in Rogosa. Na gojišču LAM VAB je izraslo pri prvem vzorčenju $4,8 \times 10^7$ KE/g, kar je 4,8 % deklariranega števila. Do zadnjega vzorčenja je število pediokokov padlo pod mejo detekcije.

4.2.7 TL- štarter

Preglednica 14: Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku TL- štarter

TL- štarter	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
BioPlus 2B - ni navedenega števila (<i>Bacillus licheniformis</i> in <i>Bacillus subtilis</i>)	BHI
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 17.2.2006	2. 3.4.2006 pred iztekom roka uporabnosti
$6,55 \times 10^4$ KE/g	$1,29 \times 10^5$ KE/g

se nadaljuje

nadaljevanje

TL- štarter

OPIS IZRASLIH KOLONIJ

- a. Okrogle, krem barve, s poudarjenim belo do rumenim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1 cm in več.

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

G+ posamične paličaste bakterije.

PCR

Vrsta *B.subtilis* ali *licheniformis* dokazana s sekvenciranjem.

- Deklaracija je pomankljiva, ker ni bilo navedenega števila bakterij vrst *Bacillus subtilis* in *Bacillus licheniformis*.
- Med skladiščenjem vzorca ni prišlo do zmanjšanja števila spor *Bacillus*. Število spor je bilo po skladiščenju celo nekoliko večje kot na začetku, kar pa ne pripisujemo dejanskemu povečanju števila, ampak prej napaki pri odvzemu vzorca, nehomogenem vzorcu ali napaki pri mikrobiološki analizi.
- Sekvenciranje je pokazalo, da gre za vrsto *Bacillus licheniformis* ali *Bacillus subtilis*.

4.2.8 PU- predštarter

Preglednica 15: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih kvasovk v izdelku PU- predštarter

PU- predštarter

DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI

4 x 10⁹ *Saccharomyces cerevisiae*
(NCYC Sc 47)
nerazumljiva deklaracija (na kg, ali na 10 kg,
kot je pakiranje)

GOJIŠČE

YGC

VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE

1. 30.1.2006
ob prejemu

1,51 x 10⁶ KE/g

2. 21.3.2006
pred iztekom roka uporabnosti

3,45 x 10⁵ KE/g

se nadaljuje

nadaljevanje

PU- predštarter

OPIS IZRASLIH KOLONIJ

- a. Okrogle, bele do rumene barve, gladke z gladkim robom, umbiliciran prečni prerez, mazave kolonije premera do 1 cm.

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

G+ večje kroglaste celice

PCR

Analiza ni bila opravljena

- Deklaracija je bila pomanjkljiva, saj ni bilo razvidno, ali je navedeno število KE v g, kg ali v enoti pakiranja (10 kg).
- Število kvasovk se je med dvomesečnim hranjenjem zmanjšalo za štirikrat.
- Na gojišču YGC smo po morfologiji kolonij sklepali, da so v preparatu res prisotne kvasovke, prav tako po morfologiji celic.

4.2.9 PU- štarter

Preglednica 16: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih kvasovk v izdelku PU- štarter

PU- štarter

DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
4×10^9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC Sc 47) nerazumljiva deklaracija (na kg, ali na 10 kg, kot je pakiranje)	YGC
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 30.1.2006 ob prejemu	2. 9.3.2006 pred iztekom roka uporabnosti
6,45 x 10 ⁵ KE/g	4,78 x 10 ⁵ KE/g

se nadaljuje

nadaljevanje

PU- štarter

OPIS IZRASLIH KOLONIJ

- a. Okrogle, bele do rumene barve, gladke z gladkim robom, mazave kolonije premera do 1 cm.

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

G+ večje kroglaste celice

PCR

Analiza ni bila opravljena

- Deklaracija je bila pomanjkljiva, saj ni bilo razvidno, ali je navedeno število KE v g, kg ali v enoti pakiranja (10 kg).
- Število kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* je bilo že pri prvem vzorčenju manjše od 10^6 KE/g, kar je premalo glede na priporočila (najmanj 10^6 ali najmanj 10^7 KE/g), med hranjenjem pa se sicer ni zelo zmanjšalo (le za cca 25 %).
- Morfologija kolonij in celic je bila tipična za kvasovke.

4.2.10 IN–Mleko Vit 2, IN–K4 acido, IN–Lactomix 16, IN–K1E, IN–Zuchterfolg

Preglednica 17: Deklaracija in gojišče za ugotavljanje števila probiotičnih bakterij in spor v izdelkih IN–Mleko Vit 2, IN–K4 acido, IN–Lactomix 16, IN–K1E, IN–Zuchterfolg

IN–Mleko Vit 2; IN–K4 acido; IN–Lactomix 16; IN–K1E;
 IN–Zuchterfolg

DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI

GOJIŠČE

V vseh izdelkih je prisoten BioPlus 2B;
 $1,4 \times 10^6$ KE/g *Bacillus licheniformis* DSM 5749, *Bacillus subtilis* DSM 5750 (1:1);

BHI, KAA

1×10^6 KE/g *Enterococcus faecium* NCIMB 10415

Preglednica 18: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN–Mleko Vit 2

IN–Mleko Vit 2	
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
2,65 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> < 100 KE/g enterokokov*	4,3 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> < 100 KE/g enterokokov
OPISI IZRASLIH KOLONIJ	
a.	Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim, valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več;
b.	Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.
c.	Enterokoki: okrogle, bele barve, gladke z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije premera do 0,5mm, kolonije obkrožajo črni madeži, ki so značilni za enterokoke.
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
<ul style="list-style-type: none"> • Enterokoki: G+ drobni koki v skupkih • Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije 	
PCR	
Vrsta <i>Bacillus subtilis</i> ali <i>Bacillus licheniformis</i> dokazana s sekvenciranjem.	

* na plošči z razredčitvijo 10⁻² je izraslo manj kot deset kolonij

Preglednica 19: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN–K4 acido

IN–K4 acido	
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
2,45 x10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> <100 KE/g enterokokov	3,68 x10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> 4,82 x 10 ² KE/g enterokokov

se nadaljuje

nadaljevanje

IN–K4 acido

OPISI IZRASLIH KOLONIJ

- a. Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več;
- b. Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm
- c. Enterokoki: okrogle, bele barve, gladke z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije premera do 0,5mm, kolonije obkrožajo črni madeži, ki so značilni za enterokoke.

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

- Enterokoki: G+ drobni koki v skupkih
- Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije

PCR

Vrsta *Enterococcus faecium* dokazana s PCR (Slika 6)

Preglednica 20: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN– Lactomix 16

IN–Lactomix 16

VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE

1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
8,5 x 10 ⁴ KE/g spor <i>Bacillus</i> <100 KE/g enterokokov*	3,45 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> < 100 KE/g enterokokov

OPISI IZRASLIH KOLONIJ

- a. Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več;
- b. Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.
- c. Enterokoki: okrogle, gladke z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije premera do 0,5mm, kolonije obkrožajo črni madeži, ki so značilni za enterokoke.

se nadaljuje

nadaljevanje

IN–Lactomix 16

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

- Enterokoki: G+ drobni koki v skupkih
- Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije

PCR

Vrsta *Enterococcus faecium* dokazana s PCR (Slika 6)

* na plošči z razredčitvijo 10^{-2} je izraslo manj kot deset kolonij

Preglednica 21: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN–K1E

IN–K1E

VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE

1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
1,3 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> < 100 KE/g enterokokov*	1,9 x 10 ⁶ KE/g spor <i>Bacillus</i> < 100 KE/g enterokokov

OPISI IZRASLIH KOLONIJ

- Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več;
- Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.
- Enterokoki: okrogle, bele barve, gladke z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije premera do 0,5mm, kolonije obkrožajo črni madeži, ki so značilni za enterokoke.

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

- Enterokoki: G+ drobni koki v skupkih
- Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije

PCR

PCR analiza ni bila narejena. Domneva o prisotnosti deklariranih vrst na osnovi opisov kolonij in barvanja po Gramu.

* na plošči z razredčitvijo 10^{-2} je izraslo manj kot deset kolonij

Preglednica 22: Rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij in spor v izdelku IN– Zuchterfolg

IN–Zuchterfolg	
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
2,27 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> 1,3 x 10 ² KE/g enterokokov	3,85 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i> < 100 KE/g enterokokov
OPISI IZRASLIH KOLONIJ	
a.	Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več; Nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.
b.	Enterokoki: okrogle, bele barve, gladke z gladkim robom, konveksne, mazave kolonije premera do 0,5mm, kolonije obkrožajo črni madeži, ki so značilni za enterokoke.
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
<ul style="list-style-type: none"> • Enterokoki: G+ drobni koki v skupkih • Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije 	
PCR	
Vrsta <i>Enterococcus faecium</i> dokazana s PCR (Slika 6).	

- Pri sorodnih izdelkih proizvajalca Inntaler, ki vsebujejo iste mikroorganizme, smo uporabili gojišči BHI za spore *Bacillus* in KAA za enterokoke.
- Izdelek IN–Mleko Vit 2 je v času prvega vzorčenja vseboval 5 % deklariranega števila spor *Bacillus*, med hranjenjem do konca roka pa se število ni zmanjšalo. Enterokokov je bilo že v svežem izdelku pod mejo detekcije (na plošči z razredčitvijo 10⁻² je izraslo nekaj manj kot deset kolonij), prav tako pri drugem vzorčenju. Vrsti *Bacillus subtilis* ali *Bacillus licheniformis* smo dokazali s sekvenciranjem.
- Podobno kot pri izdelku IN–Mleko Vit 2, smo tudi pri izdelku IN–K4 ugotovili premajhno število spor *Bacillus*, od 17 do 24 % deklariranega števila. Pri zadnjem vzorčenju IN–K4 smo sicer ugotovili nekaj enterokokov, ampak več kot 3 log premalo. Vrsto *Enterococcus faecium* smo potrdili z metodo PCR.
- V izdelku IN–Lactomix 16 smo ugotovili le 6 % deklarirane vrednosti spor *Bacillus*. Za 1,5 log enote manj bacilov, kot jih je navajala deklaracija. Število je bilo po skladiščenju vzorca večje, kar je najbrž posledica nehomogeno razdeljenih bakterij po vzorcu. Napako pripisujemo tudi sami naravi vzorca (granulat, prah,...), ki otežuje odvzem povprečnega vzorca in predstavlja problem pri

mešanju vsebine. Število enterokokov je bilo pod mejo detekcije pri obeh vzorčenjih (pri prvem vzorčenju je na plošči z razredčitvijo 10^{-2} izraslo nekaj manj kot deset kolonij).

- V izdelku IN–K1E smo pri prvem vzorčenju ugotovili 9 % deklariranega števila KE/g spor *Bacillus*, pri drugem vzorčenju se je število bacilov ravno tako povečalo. Gre za iste vzroke kot pri IN–Lactomix 16.
- Vzorec IN–Zuchterfolg je ob dobavi vseboval 16 % deklarirane koncentracije spor *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis*. Število se med hranjenjem izdelka ni zmanjšalo. Prisotnost enterokokov smo v svežem izdelku sicer ugotovili, vendar je bilo število za 4 log enote manjše od deklariranega. Po skladiščenju se je število zmanjšalo pod mejo detekcije. Vrsto *Enterococcus faecium* smo dokazali s PCR.

4.2.11 IN–F1; IN–Start A35; IN–Lactomil; IN–Start AM50

Preglednica 23: Deklaracija in gojišče za ugotavljanje prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelkih IN–F1, IN–Start A35, IN–Lactomil, IN–Start AM50

IN–F1; IN–Start A35; IN–Lactomil; IN–Start AM50	
DEKLARACIJA - MIKROORGANIZMI	GOJIŠČE
V vseh izdelkih je prisoten BioPlus 2B; $1,4 \times 10^6$ KE/g <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 5749, <i>Bacillus subtilis</i> DSM 5750 (1:1)	BHI

Preglednica 24: Rezultati ugotavljanja števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN–F1

IN–F1	
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
$6,82 \times 10^5$ KE/g spor <i>Bacillus</i>	$8,3 \times 10^5$ KE/g spor <i>Bacillus</i>

se nadaljuje

nadaljevanje

IN-F1

OPISI IZRASLIH KOLONIJ

- a. Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več.
- b. Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

- Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije

PCR

Analiza ni bila opravljena.

Preglednica 25: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN-Start A35

IN-Start A35

VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE

1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
6,45 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i>	1,51 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i>

OPISI IZRASLIH KOLONIJ

- a. Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več.
- b. Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.

OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU

- Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije

PCR

Analiza ni bila opravljena.

Preglednica 26: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN–Lactomil

IN–Lactomil	
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
5,91 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i>	6,3 x 10 ⁵ KE/g spor <i>Bacillus</i>
OPISI IZRASLIH KOLONIJ	
a.	Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več.
b.	Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.
OPIS CELIC - BARVANJE PO GRAMU	
<ul style="list-style-type: none"> • Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije 	
PCR	
Analiza ni bila opravljena.	

Preglednica 27: Rezultati ugotavljanja prisotnosti in števila spor probiotičnih bakterij v izdelku IN–Start AM50

IN–Start AM50	
VZORČENJE / ŠTEVILO UGOTOVLJENIH KE	
1. 21.3.2006	2. 12.5.2006 pred iztekom roka uporabnosti
2,64 x 10 ⁶ KE/g spor <i>Bacillus</i>	3,4 x 10 ⁶ KE/g spor <i>Bacillus</i>
OPISI IZRASLIH KOLONIJ	
a.	Bacili: okrogle, krem barve, s poudarjenim belim valovitim robom, gladke, konveksne, mazave kolonije premera do 1cm in več.
b.	Bacili: nepravilne, prozorne do bele barve, z valovitim rahlo poudarjenim robom, ploske, gladke, trde kolonije premera do 1cm.

se nadaljuje

nadaljevanje

IN–Start AM50

OPIS CELIC – BARVANJE PO GRAMU

- Bacili: G+ posamične, dolge paličaste bakterije

PCR

Analiza ni bila opravljena.

- Pri vseh štirih sorodnih vzorcih, z identično deklaracijo vsebnosti spor *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis*, smo z mikroskopiranjem ugotovili prisotnost po Gramu pozitivnih, posamičnih, dolgih palčk.
- Izdelek IN–F1 je vseboval polovico manj spor vrst *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis* od deklariranega, med skladiščenjem pa ni prišlo do zmanjšanja števila.
- V izdelku IN–Start A35 je bilo začetno število podobno kot v izdelku IN–F1, torej 50 % deklariranega, med skladiščenjem pa se je zmanjšalo do 11 % deklarirane koncentracije.
- V izdelku IN–Lactomil je bilo na začetku 42 % deklariranega števila spor *Bacillus*, po skladiščenju pa celo nekaj več, kar pripisujemo napakam pri vzorčenju oziroma izvedbi mikrobiološke analize.
- Izdelek IN–Start AM50 je edini že ob prejemu presegal deklarirano vrednost za faktor dva. Ob zadnjem vzorčenju pa smo ugotovili še nekoliko višje število spor *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis*.

4.2.12 Ugotavljanje prisotnosti DNA bakterij vrst *Enterococcus faecium*, *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis*, z vrstno specifično reakcijo PCR in s sekvenciranjem variabilne regije V1/V2 gena za 16S rRNA

Bakterijsko DNA smo pridobili iz čistih kultur *Bacillus* in *E. faecium*, s pomočjo kompleta kemikalij Wizard. V reakciji smo uporabili bodisi univerzalne bakterijske začetne nukleotide (za *E. faecium*), oziroma smo z univerzalnimi začetniki pomnožili variabilni del V1/V2 gena za 16S rRNA ter analizirali zaporedje nukleotidov. Pri vseh vzorcih smo dobili pričakovano velikost dobljenih pomnožkov.

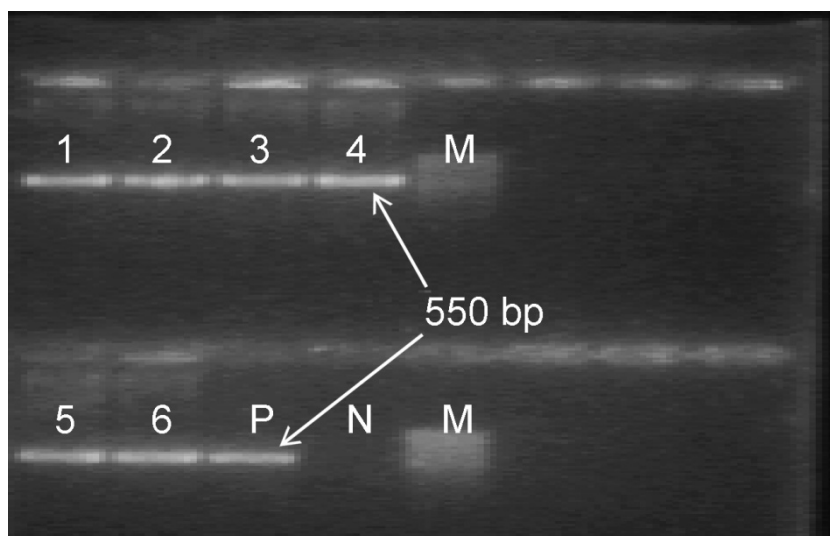
Preglednica 28: Rezultati ugotavljanja prisotnosti DNA deklariranih vrst bakterij iz čistih bakterijskih kultur, osamljenih iz izdelkov

VZOREC	Deklarirani mikroorganizmi	Mikroorganizmi, dokazani z metodo PCR	Mikroorganizmi, dokazani s sekvenciranjem V1/V2 regije 16S rDNA
S- doj	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	/	<i>Bacillus licheniformis</i> ali <i>Bacillus subtilis</i>
Vebac® 50	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	/
S- bre	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	/
Sure bio	<i>Saccharomyces</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	/	/
		<i>Enterococcus faecium</i>	/
		/	/
		/	/
IN–Mleko Vit 2	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	/	<i>Bacillus licheniformis</i> ali <i>Bacillus subtilis</i>
IN–K4 acido	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	/	/
		<i>Enterococcus faecium</i>	/
IN–Lactomix 16	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	/	/
		<i>Enterococcus faecium</i>	/
IN–Zuchterfolg	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	/	/
		<i>Enterococcus faecium</i>	/

/ nismo opravili analize

Z reakcijo PCR smo uspeli potrditi prisotnost deklariranih bakterijskih vrst na DNA, pridobljeni s komercialnim setom Wizard, iz kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih.

Enterococcus faecium je bil deklariran v osmih izdelkih, in sicer Vebac® 50, S- bre, Sure bio, IN–Mleko Vit 2, IN–K4 acido, IN–Lactomix 16, IN–K1E, IN–Zuchterfolg. Z metodo PCR smo analizirali naslednje vzorce: 1. Sure bio, 2. Vebac® 50, 3. IN–K4 acido, 4. IN–Lactomix 16, 5. IN–Zuchterfolg, 6. S- bre. *E. faecium* smo dokazali v vseh vzorcih; dobili smo pomnožke enake velikosti, kot pri *E. faecium* ATCC 19434, ki nam je služil kot kontrola (slika 6).



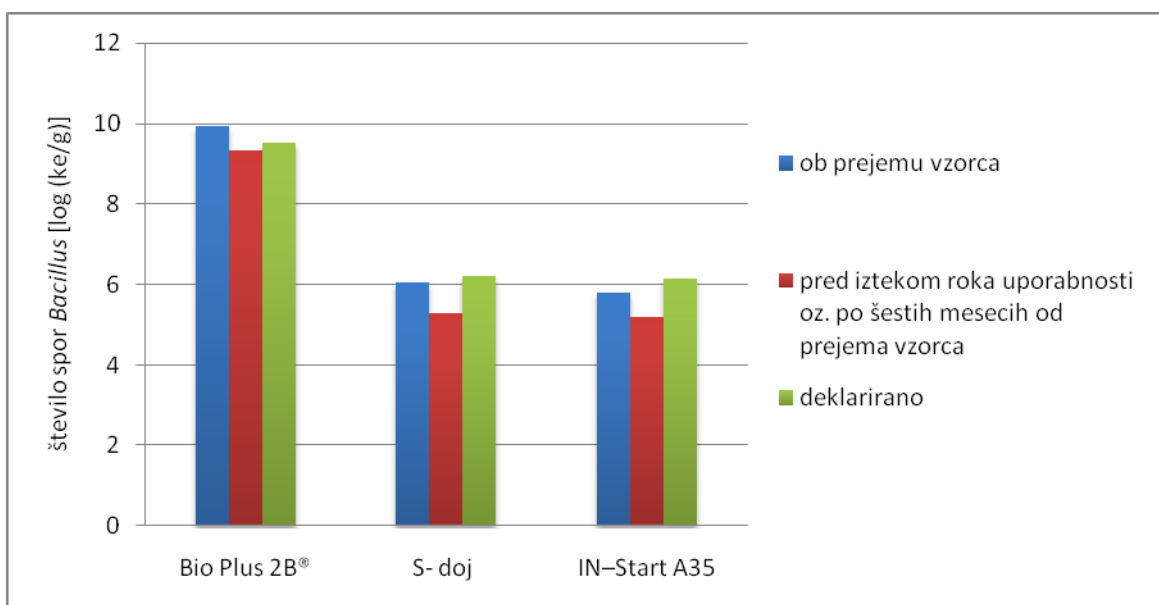
Legenda:

- 1: Sure bio
- 2: Vebac® 50
- 3: IN-K4 acido
- 4: IN-Lactomix 16
- 5: IN-Zuchterfolg
- 6: S-bre
- P: pozitivna kontrola
- N: negativna kontrola
- M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

Slika 6: Rezultati specifične reakcije PCR za vrsto *Enterococcus faecium*, na DNA pridobljeni iz kolonij, zraslih na selektivnih gojiščih

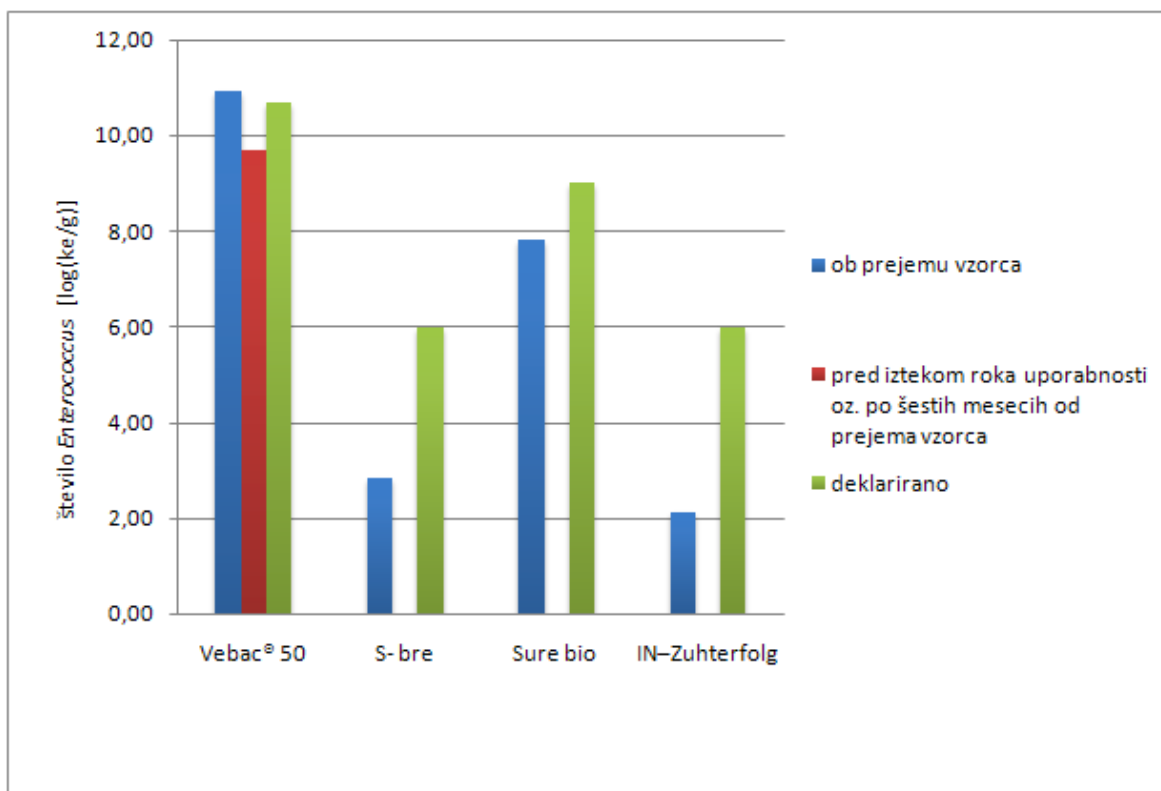
Vrsti *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis* sta bili deklarirani v 12 izdelkih. Analizirali smo 2 vzorca: IN–Mleko Vit 2 ter S- doj. Ker sta pri večini vzorcev na gojišču BHI zrasla dva tipa kolonij, smo iz vsakega od obeh omenjenih vzorcev nagojili po dve kulturi, vsako iz enega tipa kolonij. Del 16S rDNA (regiji V1/V2) smo pomnožili s postopkom PCR. Uporabili smo univerzalna bakterijska začetnika oligonukleotidov Y1 in Y2. Primerjava z zaporedji v genski banki je za vse štiri vzorce DNA pokazala pripadnost vrsti *Bacillus subtilis* ali *Bacillus licheniformis*. Prevladovali so zadetki za *Bacillus subtilis*, nekaj med njimi pa jih je bilo tudi za *Bacillus licheniformis* (Prilogi A in B). Vrsti sta očitno tako sorodni, da ju na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij regije V1/V2 16S rDNA ni bilo mogoče razlikovati.

Na slikah od 7 do 9 so prikazana števila deklariranih probiotičnih bakterij v izdelkih, ob prejemu vzorca in ob koncu roka uporabnosti.



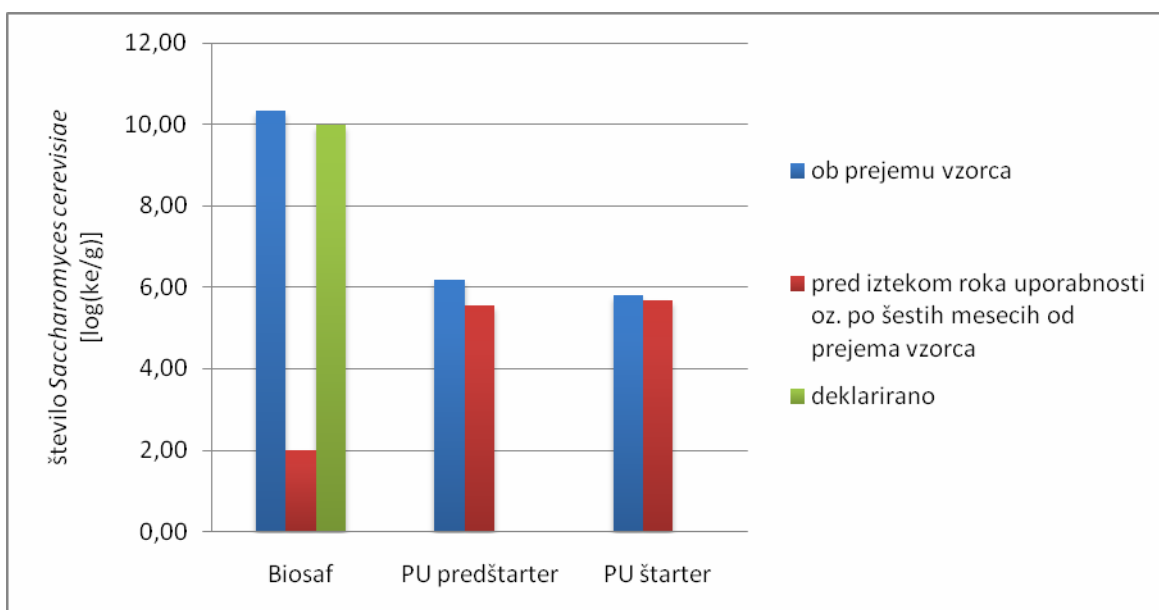
Slika 7: Število spor *Bacillus* v svežih izdelkih in ob koncu roka uporabnosti oz. po šestih mesecih od prejema vzorcev

Iz slike Slika 7 je razvidno, da so spore *Bacillus* zelo dobro preživele do konca skladiščenja, kar za spore ni presenetljivo. Njihova zmožnost preživetja v neugodnih pogojih je veliko večja od vegetativnih oblik probiotičnih bakterij.



Slika 8: Število bakterij rodu *Enterococcus* v svežih izdelkih in ob koncu roka uporabnosti oz. po šestih mesecih od prejema vzorcev

Število enterokokov je bilo zadostno le v koncentratu Vebac 50 in še to le ob prejemu vzorca, koncentracija bakterij je bila v ostalih izdelkih pod mejo detekcije.



Slika 9: Število deklariranih kvasovk vrste *Sacharomyces cerevisiae* v izdelku in ugotovljenih ob prejemu vzorca ter ob koncu roka uporabnosti

Število kvasovk vrste *Sacharomyces cerevisiae* je bilo zadostno le v koncentratu Biosaf ob prejemu vzorca, do izteka roka uporabnosti pa je padlo kar za 8 log. Zaradi nejasne deklaracije pri ostalih dveh vzorcih ne moremo soditi o ustreznosti koncentracij, na grafu pa vidimo, da se je število mikroorganizmov po skladiščenju zmanjšalo za največ 1 log enoto.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Deklaracije izdelkov

V zadnjem desetletju smo bili priča vedno večjemu zanimanju za uporabo probiotikov v prehrani ljudi in živali. Vseeno je prisotno nezaupanje, ki izhaja iz nepopolne informacije o posameznih sevih, ter premalo dokazov, pridobljenih na ciljni populaciji ljudi ali živali. Na trg je v zadnjih letih prišlo res veliko probiotičnih izdelkov, za katere je naveden zelo širok razpon delovanja, ter omenjeno več možnih učinkov na različne bolezni, pa brez zadostnih dokazov. Premalo je znanega o dejanski kolonizaciji probiotikov pri živalih, tudi morebitni terapevtski učinki niso vedno jasno navedeni (Weese in Anderson, 2002). Probiotiki, kot krmni dodatki, so pod strogim nadzorom EU od leta 1993. Poleg tega mora biti od leta 2000 vsak mikrobní sev, uporabljen kot krmni dodatek, odobren s strani Komisije EU (Becquet, 2003).

Uporaba krmnih dodatkov s probiotiki pri nas še ni tako razširjena, kar se je pokazalo že pri zbiranju vzorcev. S tovrstnimi proizvodi so bile seznanjene le večje mešalnice, ki so izrazile zanimanje za rezultate naše raziskave. Kmalu smo ugotovili, da proizvajalcem ni potrebno dokazovati, da vrsta in število živih mikroorganizmov, označenih na deklaracijah, dejansko ustreza stanju. Tudi živila s probiotiki in prehranska dopolnila, niso podvržena tako strogi kontroli kot zdravila (Weese, 2003).

Krmne mešanice so lahko v prometu, če so označene v skladu s predpisom, ki ureja kakovost in označevanje krme v prometu. Če krmne mešanice vsebujejo dodatke iz Registra krmnih dodatkov po Uredbi 1831/2003/ES (Regulation No. 1831/2003), morajo biti podatki dobro vidni, čitljivi in trajno pritrjeni tako, da so neizbrisni. Predpisano je označevanje, ki zahteva:

- identifikacijo seva oziroma sevov, ki so dovoljeni,
- številko vrste seva oziroma sevov,
- število kolonijskih enot (KE/kg),
- E registracijsko številko dodatka,
- datum poteka veljavnosti garancije ali rok trajanja,
- navedbo pomembnih značilnosti mikroorganizma, ki se nanašajo na proizvodni proces,
- podatke za pravilno uporabo krme.

Pregled deklaracij je pokazal, da so izdelki pomankljivo označeni.

- Izdelka Sure-Bio in TL-štarer nista vsebovala podatka o številu bakterij (KE/ml).
- Izdelka Pu-predštarer in Pu-štarer imata nerazumljivo navedeno število probiotičnih mikroorganizmov.

Podatke o preteku roka uporabnosti smo našli le na petih od 18 raziskanih izdelkov: BioPlus 2B®, Sure bio, TL- štarter, PU- predštarter in PU- štarter.

Kanadska študija osmih probiotikov za živali in petih za ljudi je pokazala, da so bili le trije od osmih proizvodov za živali opremljeni s podatki o vsebini. Večina izdelkov je vsebovala nižje število probiotičnih bakterij od deklariranih, v petih proizvodih je manjkal eden ali več deklariranih sevov in trije izdelki so vsebovali seve različne od deklariranih (Weese, 2002).

Na znatno nižje zahteve po kakovosti komercialnih probiotikov kaže še en primer, kjer proizvodi niso bili ustrezno označeni. Pri ugotavljanju ustreznosti označevanja 44 komercialnih probiotikov za ljudi in živali, so bili podatki o vrsti probiotika in njegovem številu, podani na vsega dveh pripravkih za ljudi in devetih za živali. Niti en pripravek ni vključeval podatka o številu mikroorganizmov ob izteku roka uporabnosti (Weese, 2003).

Med resnejše pomanjkljivosti prištevamo tiste, ki zadevajo vsebino in število bakterij v proizvodih. Prehranski dodatki, ki naj bi vsebovali žive in aktivne kulture, velikokrat sploh ne vsebujejo živih bakterij (Holzapfel in sod., 2001). Reklame nekaterih proizvajalcev so zavajajoče. Na primer, omenjajo možne pozitivne učinke, ki naj bi bili znanstveno potrjeni, čeprav so bile študije opravljene na drugih sevih, sicer iste vrste (Karpa, 2003).

5.1.2 Število probiotičnih mikroorganizmov v izdelkih

V preglednici 29 smo povzeli stanje analiziranih krmnih dodatkov z vsebnostjo probiotikov na slovenskem trgu od decembra 2005 do junija 2006, ki je prikazano s skupnimi rezultati ugotavljanja števila probiotičnih bakterij v izdelkih ob prejemu in tik pred iztekom roka uporabnosti. V primeru, da ta podatek ni bil naveden, smo zadnje vzorčenje opravili šest mesecev po prejemu izdelka.

Preglednica 29: Število deklariranih mikroorganizmov v 18 krmnih dodatkih ali mešanicah ob prejemu vzorca in ob izteku roka uporabnosti oz. po šestih mesecih skladiščenja

Izdelek	Deklarirani mikroorganizmi	KE/g ob prejemu vzorca	KE/g pred iztekom roka uporabnosti oz. po šestih mesecih od prejema vzorca
BioPlus 2B®	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$8,4 \times 10^9$	$2,06 \times 10^9$
S- doj	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$1,12 \times 10^6$	$1,93 \times 10^5$
Biosaf	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2,13 \times 10^{10}$	< 100
Vebac® 50	<i>Enterococcus faecium</i>	$8,5 \times 10^{10}$	$5,09 \times 10^9$
S- bre	<i>Enterococcus faecium</i>	$6,58 \times 10^2$	< 100

se nadaljuje

nadaljevanje			
Sure bio	<i>Saccharomyces</i>	< 100	< 100
	<i>Enterococcus</i>	$6,3 \times 10^7$	< 100
	<i>Lactobacillus</i>	< 100	< 100
	<i>Pediococcus</i>	$4,8 \times 10^7$	< 100
TL- štarter	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$6,55 \times 10^4$	$1,29 \times 10^5$
PU- predštarter	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,51 \times 10^6$	$3,45 \times 10^5$
PU- štarter	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$6,45 \times 10^5$	$4,78 \times 10^5$
IN-Mleko Vit 2	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$2,65 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$
	<i>Enterococcus faecium</i>	< 100	< 100
IN-K4 acido	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$2,45 \times 10^5$	$3,68 \times 10^5$
	<i>Enterococcus faecium</i>	ni preverjeno	$4,82 \times 10^2$
IN-Lactomix 16	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$8,5 \times 10^4$	$3,45 \times 10^5$
	<i>Enterococcus faecium</i>	ni preverjeno	< 100
IN-K1E	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$1,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$
	<i>Enterococcus faecium</i>	ni preverjeno	< 100
IN-Zuchterfolg	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$2,27 \times 10^5$	$3,85 \times 10^5$
	<i>Enterococcus faecium</i>	$1,3 \times 10^2$	< 100
IN-F1	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$6,82 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$
IN-Start A35	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$6,45 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$
IN-Lactomil	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$5,91 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$
IN-Start AM50	<i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	$2,64 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$

Probiotik mora preživeti proces priprave preparata, ki vključuje peletiranje pri visoki temperaturi, ostati mora stabilen po večtedenskem skladiščenju in aktiven po prehodu skozi neugodne pogoje želodca. Daleč najbolj stabilne in obstojne so spore *Bacillus*, ki preživijo visoke temperature in dolgotrajno skladiščenje, za razliko od vegetativnih, dehidriranih celic, kot so na primer celice bakterije *Enterococcus faecium* (Ortwin, 2005). Številne raziskave so pokazale, da različni probiotični pripravki vsebujejo manjše število bakterij, celo njihovo odsotnost ali prisotnost popolnoma drugih bakterijskih sevov, kot je označeno na deklaraciji. Omenjeno velja tako za izdelke namenjene ljudem (Holzapfel in sod., 2001), kakor tudi za krmne dodatke oziroma mešanice (Weese, 2002).

Rezultati naše raziskave govorijo v prid nezaupanju strokovnjakov in potrošnikov glede števila bakterijskih sevov v produktih, saj so pokazali nezadovoljivo stanje. Samo štirje

izdelki od 18-tih so ustrezali deklaracijam, kar zadeva število živih mikroorganizmov. Vse do konca roka uporabnosti je deklaraciji glede števila zadostil le en izdelek, IN–Start AM50. V treh izdelkih je bilo mikroorganizmov dovolj v svežem izdelku, ne pa na koncu (BioPlus 2B, Biosaf, Vebac 50). Za tri izdelke (TL Šarter, PU Predštarter, PU štarter) ne moremo dati ocene, ker je bila deklaracija pomanjkljiva ali nerazumljiva, saj ni bilo mogoče nedvoumno sklepati, za kakšno količino velja navedeno število mikroorganizmov.

Izdelek BioPlus 2B® je predstavljen kot »Pripravek, ki izboljša ješčnost, izkoriščanje krme in proizvodne lastnosti živali». Probiotik Vebac® 50 vsebuje mlečnokislinske bakterije za stabilizacijo črevesne flore živali. »Mlečnokislinske bakterije v zelo kratkem času ustvarijo živo biološko zaščitno plast na črevesni sluznici in s svojimi metaboliti zavirajo rast neželenih in škodljivih bakterij«, je zapisano na izdelku. Izdelek Sure-bio je na deklaraciji prikazan kot: »probiotik nove generacije, ki se krmi v času stresa. Vsebuje kvas, ki je nosilec kemičnih procesov, ki zagotavljajo sposobnost za življenje in učinkovitost v debelem črevesju».

Sanders leta 1999 navaja, da izbrani probiotiki zmanjšujejo pojav driske pri pujskih, kadar jih dnevno krmimo v koncentraciji $10^9 - 10^{11}$ bakterij. Nahashon in sod. (1992) ter Tortuero in Fernandez, (1995) so pokazali, da koncentrat BioPlus 2B signifikantno vpliva na težo jajca ($P < 0,05$) le, če je dodan v zadostni koncentraciji (10^9 KE/g krme) in če so mikroorganizmi še živi. Hong in sod. (2005) so ugotovili signifikantne rezultate pri poskusih in vivo na glodalcih, če so uporabljali spore bacilov v koncentraciji $10^8 - 10^{10}$ KE/g. (Anonymous, 2006) je objavil signifikantno povečanje mlečnosti pri kozah in ovcah mlečnih pasem ob dodajanju krmnega dodatka Biosaf, ki vsebuje kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Minimalna dnevna koncentracija na žival naj bi znašala $1,8 - 2,8 \times 10^9$ KE/g krme. FEEDAP Panel povzema, da ob desetkratni predoziranosti proizvoda Biosaf Sc 47 ni bilo zaznani nikakršnih nasprotnih učinkov, ter da je krmna mešanica primerna za vse prežvekovalce (Anonymous, 2006).

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je gojišče BHI ustrezno za štetje mešanice dveh bakterijskih vrst, *Bacillus licheniformis* in *Bacillus subtilis*, ki se nahajata v koncentratu BioPlus 2B, vendar ne omogoča razlikovanja obeh. Ti dve vrsti sta bili deklarirani v dvanajstih krmnih mešanicah (S-doj, TL-štarter, IN–Mleko Vit 2, IN–K4 acido, IN–Lactomix 16, IN–K1E, IN–Zuchterfolg, IN–F1, IN–Start A35, IN–Lactomil, IN–Start AM50). Kljub temu, da v nekaterih izdelkih že pri začetnem vzorčenju ni bila dosežena deklarirana raven, je bila obstojnost spor *Bacillus* zelo dobra, kar za spore ni presenetljivo. Hong in sod. (2005) navajajo, da so prednosti uporabe spor kot probiotikov njihova temperaturna stabilnost, zmožnost preživeti prehod preko trebušne bariere. To so prednosti pred ostalimi probiotičnimi bakterijami, ki se v izdelkih nahajajo v vegetativni obliki in so veliko bolj občutljive za naštete pogoje.

Za štetje kvasovk, ki so bile deklarirane v štirih vzorcih, smo uporabili gojišče YGC. V krmnem dodatku Biosaf je bilo začetno število kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* zadostno, po šestih mesecih pa je število padlo pod mejo detekcije. V krmnih mešanicah, v katere je bil dodan dodatek Biosaf (Pu-predštarter in Pu-štarter), smo sicer ugotovili prisotnost živih kvasovk pri prvem in drugem vzorčenju, pri čemer je bilo po šestih

mesecih število KE 23 % oziroma 74 % izhodiščnega, vendar zaradi nejasne deklaracije ne moremo soditi o ustreznosti koncentracij.

Krmna mešanica Sure-Bio je neprimerna že zaradi vsebnosti vrste *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1026, ki je nismo našli na seznamu dodatkov, katerih uporaba v prehrani živali je dovoljena. Dejansko nismo ugotovili prisotnosti živih kvasovk v izdelku, čeprav proizvajalec navaja, da je »*Saccharomyces cerevisiae* NCYC1026 gojena na žitni bazi in sušena, da ohrani učinek fermentacije«, po čemer bi sklepali, da gre za žive kvasovke. Pomanjkljivo je tudi navajanje drugih probiotičnih sevov, saj so omenjeni samo trije rodovi: *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Enterococcus*. Ker nismo imeli podatka o vrsti laktobacilov, smo uporabili tri gojišča: Rogosa za vse laktobacile; gojišče MRS s klindamicinom, ki je selektivno za laktobacile skupine *Lb. acidophilus* in gojišče LAM VAB, na katerem zrastejo vsi laktobacili, razen *Lb. acidophilus*. Inkubacija je potekala v anaerobnih pogojih pri 37 °C. Le na gojišču Rogosa je po izgledu kolonij sodeč zraslo nekaj laktobacilov. Podobno smo ugotovili pri pediokokih, za katere smo uporabili gojišči Rogosa in LAMVAB, ki sta selektivni za pediokoke pri aerobnih pogojih inkubacije in temperaturi inkubacije 30 °C. En mesec in pol po prejemu vzorca je bilo pediokokov samo še 5 % od deklariranega števila, po nadaljnjem skladiščenju za štiri mesece in pol pa je število padlo pod mejo detekcije.

Bakterij vrste *Enterococcus faecium* je bilo vsaj na začetku dovolj le v koncentratu Vebac 50, v krmni mešanici z dodanim pripravkom Vebac 50 pa premalo, kakor tudi v tistih petih izdelkih proizvajalca Inntaler, ki imajo deklarirano to vrsto.

V naši raziskavi se je metoda PCR izkazala za uspešno za dokazovanje prisotnosti vrste *E. faecium*.

Za vse vrste mikroorganizmov ni na voljo dovolj selektivnih začetnih oligonukleotidov za razlikovanje posameznih vrst, zato smo za potrjevanje predstavnikov rodu *Bacillus* uporabili univerzalna bakterijska začetna oligonukleotida in opravili analizo dela 16S rDNA. Analizirali smo po dve koloniji, izolirani iz selektivnega gojišča za rod *Bacillus*, po nacepivki vzorca krmne mešanice S-doj in izdelka IN- Mleko Vit 2. Pri vseh, naključno izbranih kolonijah, smo s sekvenciranjem preverili ali pripadajo vrstam *Bacillus licheniformis* in/ali *Bacillus subtilis*. Ker sta vrsti zelo sorodni, ju na podlagi analiziranih delov gena za 16S rRNA (variabilna regija V1/V2) ni bilo mogoče razlikovati. Rezultat je kot možno identifikacijo pokazal vrsto *Bacillus licheniformis* ali *Bacillus subtilis*.

V krmnem dodatku Vebac® 50, kakor tudi v krmnih mešanicah Sure bio, IN-K4 acido, IN-Lactomix, IN-Zuchterfolg, S- bre, smo z analizo kolonij s PCR, specifično za vrsto, potrdili, da so izdelki dejansko vsebovali bakterije vrste *Enterococcus faecium*.

Naša raziskava je opozorila na problem, da je v probiotičnih pripravkih, namenjenih živalski prehrani, v večini primerov dejansko število probiotičnih mikroorganizmov, ki jih vsebuje proizvod, daleč prenizko. Na osnovi teh rezultatov lahko sklepamo, da so probiotični pripravki za živali neučinkoviti. Namen probiotikov je, da s pozitivnimi učinki na gostitelja posredno vplivajo tudi na zmanjšanje stroškov v živinoreji. Na

podlagi predstavljenega pregleda izdelkov na slovenskem trgu pa lahko zaključimo, da namen ne more biti dosežen. Rejci živali so zavedeni z deklaracijo, v proizvod investirajo, pričakovane učinka pa s takimi izdelki ni.

Preverjanje kakovosti probiotičnih krmnih dodatkov bi moralo biti strožje, pri čemer bi morale biti standardizirane in predpisane tudi metode za preverjanje tovrstnih izdelkov.

5.2 SKLEPI

- V prvi polovici leta 2006 je bil slovenski trg slabo seznanjen s krmnimi dodatki oziroma mešanicami s probiotiki. Tovrstne izdelke so poznale le večje mešalnice in farmacevtske družbe. Med majhnimi ponudniki izdelki niso razširjeni, pa tudi v trgovinah s kmetijskim blagom so bili z njimi premalo seznanjeni.
- Nepopolne deklaracije smo našli na petih izdelkih: dva izdelka nista vsebovala podatka o številu mikroorganizmov, na dveh izdelkih je bilo nejasno navedeno število probiotičnih mikroorganizmov, na enem izdelku pa smo zasledili pomanjkljivo navajanje imen, saj so omenjeni samo rodovi: *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Enterococcus*.
- Na enem izdelku je bila deklarirana vrsta *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1026, ki je nismo našli na seznamu dovoljenih probiotičnih mikroorganizmov za prehrano živali.
- Podatke o preteku roka uporabnosti smo našli le na petih od 18 pregledanih izdelkov.
- Za ugotavljanje števila spor *Bacillus* je primerno gojišče BHI. Toplotna obdelava ni potrebna, saj imajo kolonije zelo razpoznavno obliko. Za *E. faecium* pa sta primerni gojišči KAA in CATC.
- Od 18-tih pregledanih izdelkov, je bilo samo v enem tudi ob koncu roka obstojnosti, oziroma če ni bil naveden, šest mesecev po prvem vzorčenju, najmanj toliko mikroorganizmov, kot je bilo deklariranih. Ob prvem vzorčenju (sveži vzorci) so bili glede števila ustrezni štirje izdelki, od tega trije koncentrirani dodatki, in ena krmna mešanica. Iz te ocene so izvzeti trije izdelki, pri katerih ni bilo deklariranega števila, oziroma je bila deklaracija nejasna.
- Vrsto *E. faecium* smo uspešno potrdili s hitro, cenovno dostopno in enostavno metodo PCR.
- Bakterijski vrsti *B. subtilis* in *B. licheniformis* smo poskusili potrditi s sekvenciranjem dela 16S rDNA. Metoda je zanesljiva, ni pa omogočila razlikovanja med obema vrstama.

6 POVZETEK

Desetletja so se antibiotiki, pri večini domačih živali, uporabljali kot krmni dodatki za pospeševanje rasti. Pod določenimi pogoji so uspeli zmanjšati pogostost driske, poleg tega sta se v večini primerov izboljšala dnevni prirast in/ali izkoristek krme tudi do 5 %. Po prepovedi uporabe antibiotikov za pospeševanje rasti, ki so jo uvedli predvsem zaradi širjenja rezistence bakterij proti antibiotikom, se kot alternativa vse bolj uveljavljajo probiotiki.

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki dokazano pozitivno učinkujejo na zdravje ljudi oziroma živali, če prispejo v prebavila v zadostnem številu. Priporočljiva koncentracija, za uspešno delovanje večine probiotikov, je približno 10^9 KE probiotika/g krme.

Zanimalo nas je, kakšna je kakovost krmnih dodatkov s probiotiki na slovenskem trgu. Analizirali smo 18 vzorcev, ki smo jih dobili od večjih mešalnic in farmacevtskih družb. Želeli smo ugotoviti, kakšno je število prisotnih probiotičnih mikroorganizmov v probiotičnih pripravkih in ali deklaracije ustrezajo dejanski sestavi izdelkov. Na dveh izdelkih je bilo nejasno navedeno število probiotičnih mikroorganizmov, medtem ko pri dveh izdelkih sploh nismo zasledili podatka o številu probiotičnih mikroorganizmov. Poleg podatka o številu mikroorganizmov, na enem izdelku ni bilo navedenih probiotičnih sevov, navedeni so bili le trije rodovi bakterij, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* in vrsta *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1026, ki je ni na seznamu dodatkov, dovoljenih v prehrani živali. Podatke o roku uporabnosti je vsebovalo le pet od 18-tih izdelkov na našem tržišču.

Naša raziskava je pokazala nezadostno število probiotičnih mikroorganizmov v večini vzorcev, saj smo le pri enem izdelku ugotovili deklarirano število mikroorganizmov v izdelku tudi ob koncu roka uporabnosti. Število spor je bilo celo višje od deklariranega. Ob takih rezultatih se nam porajajo dvomi o pričakovanih učinkih teh proizvodov. Števila probiotikov smo ugotavljali na podlagi rasti na selektivnih gojiščih. Vrsto bakterij smo potrdili z reakcijo PCR in uporabo vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov, oziroma s sekvenciranjem dela 16S rDNA. Uspeli smo potrditi prisotnost deklariranih vrst bakterij na DNA iz čistih bakterijskih kultur, osamljenih z uporabo komercialnega seta reagentov Wizard za izolacijo genomske DNA.

Potrdili smo predvidevanja, da je na slovenskem trgu kar nekaj probiotičnih izdelkov, namenjenih živalski prehrani, ki ne ustrezajo deklaraciji. Tako stanje je deloma posledica stanja na področju zakonodaje, saj proizvajalcem še vedno ni potrebno dokazovati števila, viabilnosti in vrst probiotičnih mikroorganizmov, ki so navedeni na deklaraciji. Področje probiotičnih krmnih dodatkov je sicer že precej bolj urejeno kot pred leti, vendar kontrola izdelkov še ni zakonsko dovolj regulirana, saj ni predpisanih standardnih metod za mikrobiološke analize. Glede na to, da je interes za probiotične izdelke vse večji, je skrajni čas, da se področje probiotikov ustrezno uredi.

7 VIRI

- Adami A., Cavazzoni V. 1999. Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *Journal of Basic Microbiology*, 39: 3-9
- Alexopoulos C., Georgoulakis I.E., Tzivara A., Kritas S.K., Siochu A., Kyriakis S.C. 2004. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 88: 381-392
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Aranzazu Martinez M. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45: 91-95
- Anonymous. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a joint FAO/WHO expert on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live acid bacteria. Córdoba, Argentina, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 34 str. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf> (okt. 2006)
- Anonymous. 2006. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety and efficacy of the product Biosaf Sc 47, a preparation of *Saccharomyces cerevisiae*, as a feed additive for dairy small ruminants. *The EFSA Journal*, 379: 1-9 http://www.efsa.europa.eu/science/feedap/feedap_opinions/1355_en.html (dec. 2008)
- Becquet P. 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 247-254
- Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2006. Demonstration of suitability of probiotic products : an emphasis on survey of commercial products obtained on Slovenian market. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 17: 38-40
- Castagliuolo I., Riegler M.F., Valenick L., Lamont J.T., Pothoulakis C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* Toxins A and B in Human Colonic Mucosa. *Infection and Immunity*, 67: 302-307
- Chaucheyras-Durand F., Fonty G. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 1: 57-68
- Chaucheyras-Durand F., Fonty G. 2002. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14: 30-36
- Chaucheyras-Durand F., Fonty G., Bertin G., Salmon J.M., Gouet P. 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*, 42 : 927-933
- Chaucheyras-Durand F., Fonty G., Bertin G., Théveniot M., Gouet P. 1998. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reproduction Nutrition Development*, 38 : 275-280
- Czerucka D., Rampal P. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*, 4: 733-739
- Dawson K.A. Hopkins D.M. 1991. Differential effects of live yeast on the cellulolytic activities of anaerobic ruminal bacteria. *Journal of Animal Science*, 69 (Suppl. 1): 531 (Abstr).
- Dawson K.A., Newman K.E., Boling J.A. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *Journal of Animal Science*, 68, 10: 3392-3398
- Direktiva št. 95/69/ES. Pravilnik o pogojih za vpis v register obratov iz tretjih držav in njihovih zastopnikov na področju krme. Ur.l. RS št. 28-1208/2004
- Direktiva št. 95/11/ES z dne 4. maja 1995 o spremembi Direktive Sveta 87/153/EGS o določitvi smernic za oceno dodatkov v prehrani živali. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnika o krmnih dodatkih. Ur.l. ES št. L 106/23/1995
- Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M. 2004. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2161-2171

- El Hassan S.M., Newbold C.J., Wallace R.J. 1993. The effect of yeast culture on rumen fermentation: growth of the yeast in the rumen and the requirement for viable yeast cells. *Animal Production*, 56: 463 (Abstr).
- European Commission. 2000. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the safety of use of *Bacillus* species in animal nutrition, 17 February 2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/outcome_en.html/ (16. nov. 2007)
- European Commission. 2003. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of micro-organism resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance, adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf/ (11. nov. 2007)
- Euzéby J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 2: 590–592. <http://www.bacterio.cict.fr/> (okt. 2005)
- FAO/WHO. 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada, April 30 – May 1, 2002. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf/> (9. sept. 2005)
- Fonty G., Joblin K.N. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. V: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Tsuda T., Sasaki Y., Kawashima R. (eds.). Oxford, UK, Academic Press: 655–679
- Fonty G., Jouany J.P., Forano E., and Gouet P. 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. V: *Nutrition des Ruminants Domestiques*. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.H., Journet M. (eds.). Paris Cedex, France, INRA Editions: 299–347
- Fuller R. 2005. History and development of probiotics. <http://www.albertaclassic.net/probiotics.php> (14. maj 2007)
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365–378
- Fuller R. 1999. Probiotics for farm animals. V: *Probiotics: A critical Review*. Tannock G.W. (ed.). Wymondham, UK, Horizon Scientific Press : 15–22
- Gedek B. R. 1991. Regulation of the intestinal flora by food. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 191: 277–301
- Girard I.D., Dawson K.A. 1994. Effects of yeast culture on the growth of representative ruminal bacteria. *Journal of Animal Science*, 77 (Suppl. 1): 300 (Abstr).
- Girard I.D., Jones C.R., Dawson K.A. 1993. Lactic acid utilization in rumen-stimulating cultures receiving a yeast culture supplement. *Journal of Animal Science*, 71 (Suppl. 1): 288 (Abstr).
- Guarner F., Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237–238
- Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas-Masiedo P., Margolles A., Reyes-Gavilan C.G. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, 37: 839–850
- Harmsen H.J.M., Raangs G.C., He T., Degener J.E., Welling G.W. 2002. Extensive set of 16S rRNA based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2982–2990
- Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. 1992. Probiotics: general view. V: *Lactic acid bacteria in health and disease*. Wood J.B.J. (ed.). London, UK, Elsevier: 151–179
- Herzog-Velikonja B., Gruden K., Pašič L. 2001. Praktikum iz molekularne biologije. Ljubljana, Študentska založba: 59–65
- Hoa N.T., Duc L.H., Istatico R., Baccigalupi L., Ricca E., Van P.H., Cutting S. 2001. Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3819–3823
- Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365–373
- Hong H.A., Duc le H., Cutting S.M. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 4: 813–835
- IDF Standard 100B. 1991. Milk and milk production - Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C: 3 str.
- Jadamus A., Vahjen W., Schäfer K., Simon O. 2002. Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 86: 42–54

- Jørgensen J.N. Kürti P. 2004. Novel approach to reduce pre-weaning mortality. *International Pig Topics*, 19, 1: 11-13
- Jouany J.P., Broudiscou L., Prins R.A., Komisarczuk-Bony S. 1995. Métabolisme et Nutrition de la Population Microbienne du Rumen. V: *Nutrition des Ruminants Domestiques*. Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.H., Journet M. (eds.). Paris Cedex, France, INRA Editions: 349-381
- Kaiser G.E. 2005. Enumeration of microorganisms. Catonsville Campus, The Community College of Baltimore County. <http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/lab4/lab4.html> (apr. 2006)
- Karpa K.D. 2003. Selecting probiotics. V: *Bacteria for Breakfast*. Karpa K.D. (ed.). Victoria, BC, Canada, Trafford Publishing: 237-261
- Koch A. L. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 257-259
- Lata J., Juránková J., Doubek J., Pfiřbramská V., Friř P., Dítů P., Koláři M., Scheer P., Kosáková D. 2005. Labelling and Content Evaluation of Commercial Veterinary Probiotics. *Acta Veterinaria*, Brno, 75, 1: 139-144
- Lilly D. Stillwell R. 1965. Probiotics: Growth – Promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748
- Marteau P., Pochart P., Doré J., Béra-Maillet C., Bernalier A., Corthier G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4939-4942
- Medina B., Girard I.D., Jacotot E. Julliard V. 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *Journal of Animal Science*, 80: 2600-2609
- Michalet-Doreau B. and Morand D. 1996. Effect of yeast culture, *Saccharomyces cerevisiae*, on ruminal fermentation during adaptation to high concentrate feeding. *Annales de Zootechnie*, 45 (Suppl 1): 337-337
- Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. 2008. Seznami krmnih dodatkov. Vlada Republike Slovenije: 120 str. http://www.mkgp.gov.si/si/o_ministrstvu/direktorati/direktorat_za_varno_hrano/starasektor_za_varnost_in_kakovost_hrane_in_krme/seznami_krmnih_dodatkov/seznami_krmnih_dodatkov/ (19. mar. 2008)
- Mothershed E., Whitney A.M. 2005. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, 363: 206-220
- Nahashon S.N., Nakaue H.S., Mirosh L.W. 1992. Effect of direct-fed microbials on nutrient retention and production parameters of laying pullets. *Poultry Science*, 71 (Suppl. 1): 111 (Abstr).
- Newbold C.J., Wallace R.J., Chen X.B. McIntosh F.M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *Journal of Animal Science*, 73: 1811-1818
- Ortwin S. 2005. Micro-Organisms as Feed Additives – Probiotics. *Advances in Pork Production*, 16: 161-167.
- Perdignon G., de Macias M.E., Alvarez S., Oliver G., de Ruiz Holgado A.P. 1988. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milk with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*, 63, 1: 17-23
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Veriřna reakcija s polimerazo-nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. *Medicinski razgledi*, 33: 379-400
- Probiotics in animal nutrition. 2005. FEFANA Absl, Editgraph, Goussainville, France: 5-51. <http://www.fefana.org/resources/documents/publications/total%20def%20probio.pdf> (maj 2005)
- Promega. 2005. Usage information. Madison, WI, Promega Corporation. <http://www.promega.com> (nov. 2005)
- Qamar A., Aboudola S., Warny M., Michetti P., Pothoulakis C., Lamont J.T., Kelly C.P. 2001. *Saccharomyces boulardii* Stimulates Intestinal Immunoglobulin A Immune Response to *Clostridium difficile* Toxin A in mice. *Infection and Immunity*, 69: 2762-2765
- Regulation No. 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. 2003. *Official Journal of the European Union*, L 268: 29-43
- Russell J.B. 2002. *Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition*. New York, Ithaca, Russell J.B. Publishing Co.: 121 str.

- Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W.M., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E., Matilla - Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 93–106
- Sanders M. 1999. Probiotics. *Foodtechnology*, 53: 67–77
- Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A. 2003. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevobacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 101-110
- Servin A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 4: 405-440
- Shah N.P. 2000. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907
- Stewart C.S., Hillman K. Maxwell F.J. 1995. Effects of probiotics on the gut microbiology of animals. V: Medical and dental aspects of anaerobes. Duerden B., Wade W.G., Brazier J.S., Eley A., Wren B. Hudson M.J. (eds.). Northwood, Science Reviews Ltd: 109-120
- Tajima K., Arai S., Ogata K., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Aminov R. I., Benno Y. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe*, 6: 273–284
- Tortuero F., Fernandez E. 1995. Effect of inclusion of microbial culture in barley-based diets fed to laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 53: 255-265
- Ward L., Brown J., Graham D. 1998. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 166: 15-21
- Weese J.S., Anderson M.E.C. 2002. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *Canadian Veterinary Journal*, 43: 771–774
- Weese J.S. 2003. Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics. *Canadian Veterinary Journal*, 44, 12: 982–983
- Weese J.S. 2002. Microbiologic evaluation of commercial probiotics. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 220: 794–797
- Young J. 1998. European market developments in prebiotic- and probiotic- containing foodstuffs. *British Journal of Nutrition*, 80 (Suppl. 2): 231-233

Milošević L. Ugotavljanje ustreznosti probiotičnih krmnih dodatkov.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko, 2008

ZAHVALA

PRILOGE

Priloga A1:

Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku Mleko Vit 2 - prvi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*:

5’-

GGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTG
TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGAT
GGACCCGCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAG-3’

Primerjava s sekvencami v genski banki:

<i>Bacteria</i>	100	22	[root; cellular organisms]
	zadetkov	organizmov	
<i>bakterija ni bila kultivirana</i>	2	1	[okoljski vzorci]
	zadetka	organizem	
<i>Bacillus</i>	97	20	[Firmicutes; B acilli; Bacillales;
	zadetkov	organizmov	Bacillaceae]
<i>Bacillus subtilis</i>	77	2	
	zadetkov	organizma	
<i>Bacillus subtilis subsp subtilis</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp NIOT-4</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus s- ni bil kultiviran</i>	1	1	[okoljski vzorci]
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp CPIS4</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp CPIS1</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus velezensis</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp DN9(2007)</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp D4</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp D1(2007)</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp ZHC10</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp ZI</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus licheniformis</i>	3 zadetki	1	
		organizem	
<i>Bacillus sp 1130-273-22</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp DC34</i>	1	1	

<i>Bacillus sp F2(2007b)</i>	zadetek	organizem	
	1	1	
<i>Bacillus sp EGU726</i>	zadetek	organizem	
	1	1	
<i>Bacillus sp EGU725</i>	zadetek	organizem	
	1	1	
<i>Bacillus sp EGU724</i>	zadetek	organizem	
	1	1	
<i>Bacillus sp EGU716</i>	zadetek	organizem	
	1	1	
<i>bacterium EAB-2EF1101</i>	zadetek	organizem	[unclassified Bacteria; unclassified Bacteria (miscellaneous)]
	1	1	
	zadetek	organizem	

Priloga A2:

Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku Mleko Vit 2 - drugi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*:

5'-

GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTT
GTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGA
TGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAG-3'

Primerjava s sekvencami v genski banki:

Bacteria	100	22	[root; cellular organisms]
	zadetkov	organizmov	
<i>bakterija ni bila kultivirana</i>	2 zadetka	1 organizem	[okoljski vzorci]
<i>Bacillus</i>	97	20	[Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae]
	zadetkov	organizmov	
<i>Bacillus subtilis</i>	77	2 organizma	
	zadetkov		
<i>Bacillus subtilis subsp subtilis</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp NIOT-4</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp-ni bil kultiviran</i>	1 zadetek	1 organizem	[okoljski vzorci]
<i>Bacillus sp CPIS4</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp CPIS1</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus velezensis</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp DN9(2007)</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp D4</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp D1(2007)</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp ZHC10</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp Z1</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus licheniformis</i>	3 zadetki	1 organizem	
<i>Bacillus sp 1130-273-22</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp DC34</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp F2(2007b)</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp EGU726</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp EGU725</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp EGU724</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp EGU716</i>	1 zadetek	1 organizem	
bacterium <i>EAB-2EF1101</i>	1 zadetek	1 organizem	[unclassified Bacteria; unclassified Bacteria (miscellaneous)]

Priloga B1:

Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku S-doj - prvi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*:

GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
 CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTT
 GTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGA
 TGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCNACG
 ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAG

Primerjava s sekvencami v genski banki:

Bacteria	100	24	[root; cellular organisms]
	zadetkov	organizmov	
<i>bakterija ni bila kultivirana</i>	2	1	[okoljski vzorci]
	zadetka	organizem	
<i>Bacillus</i>	97	22	[Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae]
	zadetkov	organizmov	
<i>Bacillus subtilis</i>	76	1	
	zadetkov	organizem	
<i>Bacillus sp NIOT-4</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp NIOT-2</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp –ni bil kultiviran</i>	1	1	[okoljski vzorci]
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp CPIS4</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp CPIS1</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus velezensis</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp BAM65</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp DN9(2007)</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp D4</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp D3(2007)</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp D1(2007)</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp G1DM-80</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp ZHC10</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp Z1</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp 1130-273-22</i>	1	1	

	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp DC34</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp F2(2007b)</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp EGU726</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp EGU725</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
<i>Bacillus sp EGU724</i>	1	1	
	zadetek	organizem	
bacterium <i>EAB-2EF1101</i>	1	1	[unclassified Bacteria; unclassified Bacteria
	zadetek	organizem	(miscellaneous)]

Priloga B2:

Rezultati sekvenciranja PCR produktov DNA, ki je bila osamljena iz čiste kulture bakterij, prisotnih v izdelku S-doj - drugi morfološki tip kolonij na selektivnem agarju za rod *Bacillus*:

GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
 CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTT
 GTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGA
 TGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCNACG
 ATGCGTAGCCGACCTGANAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCA

Primerjava s sekvencami v genski banki:

Bacteria	100 zadetkov	22 organizmov	[root; cellular organisms]
<i>bakterija ni bila kultivirana</i>	2 zadetka	1 organizem	[okoljski vzorci]
<i>Bacillus</i>	97 zadetkov	20 organizmov	[Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae]
<i>Bacillus subtilis</i>	77 zadetkov	1 organizem	
<i>Bacillus sp NIOT-4</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp NIOT-2</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp-ni bil kultiviran</i>	2 zadetka	1 organizem	[okoljski vzorci]
<i>Bacillus sp CPIS4</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp CPIS1</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus velezensis</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp BAM65</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp DN9(2007)</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp D4</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp D3(2007)</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp D1(2007)</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp G1DM-80</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp ZHC10</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp Z1</i>	1 zadetek	1 organizem	

<i>Bacillus licheniformis</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp 1130-273-22</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp DC34</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp F2(2007b)</i>	1 zadetek	1 organizem	
<i>Bacillus sp EGU726</i>	1 zadetek	1 organizem	
bacterium <i>EAB-2EF1101</i>	1 zadetek	1 organizem	[unclassified Bacteria; unclassified Bacteria (miscellaneous)]