

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Simon RAŽMAN

**VPLIV SEVOV *Lactobacillus gasseri* LF221 IN K7 NA
MORFOMETRIČNE PARAMETRE RESIC IN
SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE TANKEGA
ČREVESJA PRI ODSTAVLJENIH PUJSKIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Simon RAŽMAN

**VPLIV SEVOV *Lactobacillus gasseri* LF221 IN K7 NA
MORFOMETRIČNE PARAMETRE RESIC IN SESTAVO
MIKROBNE ZDRUŽBE TANKEGA ČREVESJA PRI
ODSTAVLJENIH PUJSKIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF *Lactobacillus gasseri* LF221 AND K7 STRAINS
ON MORPHOMETRICAL PARAMETERS OF INTESTINAL VILLI
AND ON THE COMPOSITION OF SMALL INTESTINE'S
MICROFLORA OF WEANED PIGLETS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomska naloga je zaključek univerzitetnega študija kmatijstvo-zootehnika. Opravljena je bila na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete. Poskus je bil izveden v poskusnem hlevu Oddelka za zootehniko, v laboratorijih Katedre za mlekarstvo pa so bili pripravljene probiotiki in opravljene mikrobiološke analize črevesne sluznice. Na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani, so bile opravljene morfometrične meritve črevesnih resic.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Ireno Rogelj in za somentorico prof. dr. Azro Pogačnik.

Recenzent: prof. dr. Janez SALOBIR

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Jure POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: prof. dr. Azra POGAČNIK
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za anatomijo, histologijo in embriologijo
- Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Simon Ražman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.4.084/.087(043.2)=163.6
KG	prašiči/prehrana živali/krmni dodatki/probiotiki/prebavni trakt/prebavila/črevesne resice/mikroflora
KK	AGRIŠ L51/5300
AV	RAŽMAN, Simon
SA	ROGELJ, Irena (mentor)/POGAČNIK, Azra (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2009
IN	VPLIV SEVOV <i>Lactobacillus gasseri</i> LF221 IN K7 NA MORFOMETRIČNE PARAMETRE RESIC IN SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE TANKEGA ČREVESJA PRI ODSTAVLJENIH PUJSKIH
TP	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 55 str., 11 pregl., 18 sl., 53 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Probiotiki se vse bolj uveljavljajo tudi kot krmni dodatki. Namen naše naloge je bil ugotoviti ali se probiotična seva <i>Lactobacillus (Lb.) gasseri</i> LF221(Rif ^r) in <i>Lb. gasseri</i> K7(Rif ^r) pripenjata na črevesno sluznico odstavljenih pujskov, ali vplivata na morfometrične parametre črevesnih resic in na sestavo mikrobne združbe sluznice tankega črevesa ter ali obstaja povezava med parametri črevesnih resic in ravnimi parametri. Raziskava je bila opravljena <i>in vivo</i> na 24-ih odstavljenih pujskih, naključno razdeljenih v 3 poskusne skupine. Pujski dveh poskusnih skupin so prejeli 2 tedna enkrat dnevno po 5×10^{10} ke laktobacilov seva <i>Lb. gasseri</i> LF221(Rif ^r) oziroma K7(Rif ^r). Tretja skupina je bila kontrolna. Pujske smo stekali ob vhljevanju ter 5., 13. in 19. dan. Po 2 pujske iz vsake skupine smo 5. in 20. dan žrtvovali ter odvzeli vzorec dvanajstnika, teščka in vitega črevesa za morfometrične meritve črevesnih resic in mikrobiološko analizo črevesne sluznice. Ugotavljali smo razlike med skupinami in znotraj skupine v prirastu in višini črevesnih resic posameznega dela črevesa, vpliv dodanih probiotikov na prirast pujskov, povezavo med višino resic in telesno maso, sposobnost poselitve oziroma zadrževanja omenjenih sevov v črevesu ter mikrobiološko sestavo črevesne sluznice. Seva LF221(Rif ^r) in K7(Rif ^r) smo odkrili v črevesni sluznici posameznih živali 5. dan, v blatu in vsebini posameznih delov črevesa pa tudi 20. dan, ko je minilo 6 dni od zadnjega odmerka. Razlike v prirastu med skupinami pujskov niso bile statistično značilne. Značilne povezave med telesno maso ali aplikacijo probiotičnih sevov in višino resic nismo ugotovili za nobeno skupino. Ugotovili smo velike razlike v številu koliformnih bakterij in laktobacilov med živalmi iz iste skupine. Neposrednega vpliva aplikacije sevov K7(Rif ^r) ali LF221(Rif ^r) na število koliformnih bakterij nismo ugotovili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 636.4.084/.087(043.2)=163.6
 CX pigs/animal nutrition/feed additives/probiotics/intestine/intestinal villi/microflora
 CC AGRIS L51/5300
 AU RAŽMAN, Simon
 AA ROGELJ, Irena (supervisor)/POGAČNIK, Azra (co-supervisor)
 PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
 PY 2009
 TI THE INFLUENCE OF *Lactobacillus gasseri* LF221 AND K7 STRAINS ON MORPHOMETRICAL PARAMETERS OF INTESTINAL VILLI AND ON THE COMPOSITION OF SMALL INTESTINE'S MICROFLORA OF WEANED PIGLETS
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO X, 55 p., 11 tab., 18 fig., 53 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Probiotics are increasingly used also as feed supplements in piglet nutrition. The aim of our thesis was to investigate the adhesion of *Lactobacillus (Lb.) gasseri* LF221(Rif^r) and *Lb. gasseri* K7(Rif^r) strains to intestinal mucosa of weaned piglets, the possible effects of two strains on morphometrical parameters of intestinal villi and on the composition of small intestine's microflora, as well as to establish whether there is a correlation between the intestinal villi parameters and growth parameters. Research was performed *in vivo* on 24 weaned piglets, randomly distributed in 3 groups. Pigs assigned to two experimental groups were given 5×10^{10} cfu of lactobacilli *Lb. gasseri* LF221(Rif^r) or K7(Rif^r) strain once daily for two weeks. The pigs of the third group represented the control group. We weighed the pigs at the beginning of experiment and also on day 5, 13 and 19. Two pigs from each group were sacrificed on day 5 and 20 in order to obtain samples of duodenum, jejunum and ileum for morphometrical analysis of intestinal villi and microbiological examination of intestinal mucosa. The differences in weight gain and height of intestinal villi from different parts among the groups and within groups, effect of applied probiotics on the weight gain, correlation between villi height and body weight, the colonization or persistence ability of two probiotic strains and microbiological composition of intestinal mucosa were studied. LF221(Rif^r) and K7(Rif^r) strains were detected in intestinal mucosa of individual animals on day 5, while in faecium and in intestinal content of particular parts also on day 20, i.e. six days after the last dose. The differences in weight gain among the groups were not statistically significant. Significant effect of body weight or probiotic application on the microvilli height was also not found in any group. We established evident differences in coliform and lactobacilli viable counts among animals within the same group. Direct effect of LF221(Rif^r) or K7(Rif^r) application on coliform counts was not established.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 PROBIOTIKI	4
2.1.1 Definicija probiotikov	4
2.1.2 Zgodovina raziskav probiotikov	4
2.1.3 Probiotični mikroorganizmi	5
2.1.3.1 Mlečnokislinske bakterije kot probiotiki	6
2.1.3.2 Lastnosti mlečnokislinskih bakterij	6
2.1.3.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	7
2.1.4 Lastnosti, pomembne za učinkovitost probiotikov	7
2.1.4.1 Sposobnost pripenjanja (adhezije)	7
2.1.4.2 Sposobnost naselitve	7
2.1.4.3 Protimikrobno delovanje	8
2.1.5 Probiotični proizvodi	8
2.1.5.1 Mleko in mlečni izdelki kot medij za prenos probiotičnih organizmov	9
2.1.6 Zakonodaja na področju probiotikov	11
2.1.7 Vplivi probiotikov	11
2.1.7.1 Pozitivni vplivi probiotikov na gostitelja	11
2.1.7.2 Možni negativni stranski učinki probiotikov	12
2.2 PREBAVNI TRAKT	12
2.2.1 Zgradba prebavnega trakta monogastričnih živali	13
2.2.1.1 Usta	13
2.2.1.2 Želodec	13
2.2.1.3 Tanko črevo	14
2.2.1.4 Debelo črevo	15

2.3	GASTROINTESTINALNA MIKROFLORA	15
2.3.1	Razvoj mikroflore pri prašiču in človeku	16
2.3.2	Pomen mikroflore v prebavi prašiča	17
2.3.3	Simbioza mikroflora - gostitelj	17
2.3.4	Mikroflora in imunski sistem	18
3	MATERIAL IN METODE	19
3.1	OPIS POSKUSA	19
3.1.1	Transport živali in vhlevitev	20
3.1.2	Aplikacija probiotičnih pripravkov in rokovanje s pujski	21
3.1.3	Odvzem vzorcev črevesja za histološko in mikrobiološko analizo ČS	21
3.1.4	Priprava vzorcev črevesja za morfometrične meritve ČS	21
3.1.5	Morfometrična analiza resic tankega črevesa	22
3.1.6	Mikrobiološka analiza mukoze	22
3.1.7	Statistične metode	23
4	REZULTATI	24
4.1	VPLIV DODANIH PROBIOTIKOV NA RAZVOJ TELESNE MASE IN PRIRAST PUJSKOV	24
4.1.1	Regresijska analiza telesne mase pujskov v odvisnosti od časa	28
4.1.1.1	Linearna odvisnost med maso pujskov in časom krmljenja skupine K7	28
4.1.1.2	Linearna odvisnost med maso pujskov in časom krmljenja skupine LF	29
4.1.1.3	Linearna odvisnost med maso pujskov in časom krmljenja za kontrolne skupine	29
4.2	REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE ČREVESNE SLUZNICE	30
4.3	UGOTAVLJANJE VIŠIN ČREVESNIH RESIC	32
4.3.1	Vpliv skupine na višino ČR v posameznem delu črevesja	33
4.3.1.1	Dvanajstnik	34
4.3.1.2	Tešče črevo	35
4.3.1.3	Vito črevo	36
4.3.2	Razlike v višini ČR posameznih delov črevesa, med 5. in 20. dnem, znotraj skupine	37
4.3.2.1	Dvanajstnik	37
4.3.2.2	Tešče črevo	37
4.3.2.3	Vito črevo	37
4.3.3	Razlike v višini ČR celotnega proučevanega črevesja med 5. in 20. dnem, znotraj skupine	38

4.4	VIŠINA ČR V POSAMEZNEM DELU ČREVESJA, NEODVISNO OD SKUPINE	41
4.5	POVEZAVA MED VIŠINO RESIC IN TELESNO MASO	43
4.5.1	Dvanajstnik	43
4.5.2	Tešče črevo	44
4.5.3	Vito črevo	45
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.1.1	Telesna masa in prirast posamezne skupine	46
5.1.2	Sestava mikrobne združbe tankega črevesja	46
5.1.3	Višina resic	47
5.1.4	Odvisnost višine ČR od telesne mase	48
5.2	SKLEPI	49
6	POVZETEK	50
7	VIRI	51
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl.1: Vrste laktobacilov in bifidobakterij, najpogostejši probiotiki (Holzpfel in sod., 1998)	6
Pregl.2: Seznam bolj razširjenih probiotičnih organizmov, ki jih uporabljajo za mlečne proizvode (fermentirani napitki, sir in mleko) (Sanders in Huis in't Veld, 1999)	9
Pregl.3: Potencialni ugodni učinki probiotikov pri farmskih živalih	11
Pregl.4: Sestava popolne krmne mešanice za sesne pujske PU-PRESTARTER	20
Pregl.5: Telesna masa posameznega pujska na dan tehtanja	24
Pregl.6: Povprečna masa pujskov ($\pm$ s.d.) dveh testnih skupin in ene kontrolne med trajanjem poskusa	25
Pregl.7 :Prirast posameznega pujska po obdobju	26
Pregl.8: Povprečni prirast pujskov v posamezni skupini v različnih obdobjih	27
Pregl.9: Število kolonijskih enot kaliformnih bakterij, laktobacilov in testnih probiotičnih sevov <i>L. gasseri</i> , K7 in LF221 v črevesni sluznici različni delov črevesa, vsebini vitega črevesa in blatu pujskov žrtvovanih 5. ali 20 dan	30
Pregl.10: Rezultati meritev višin ČR na vzorcih dvanajstnika, vitega črevesa in teščega črevesa	
Pregl.11: Rezultati T testa pri analizi dolžine ČR med dvema pujkoma posamezne skupine na vzorcih dvanajstnika, vitega črevesa in teščega črevesa	33

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prebavni trakt prašiča (McDonald in sod., 2002)	13
Slika 2: Poskusne kletke s pujski	20
Slika 3: Razvoj telesne mase pujskov, razdeljenih v tri skupine	25
Slika 4: Povprečni prirast pujskov v posamezni skupini v različnih obdobjih	27
Slika 5: Napoved teže za skupino K7	28
Slika 6: Napoved teže za skupino LF	29
Slika 7: Napoved teže za kontrolno skupino	29
Slika 8: Vzdolžni prerez črevesnih resic dvanajstnika	34
Slika 9: Vzdolžni prerez črevesnih resic teščega črevesa	35
Slika 10: Vzdolžni prerez črevesnih resic vitega črevesa	36
Slika 11: Višine ČR dvanajstnika pri 12-ih živalih, žrtvovanih 5. ali 20. dan poskusa	38
Slika 12: Višine ČR teščega črevesa pri 12-ih živalih, žrtvovanih 5. ali 20. dan poskusa	39
Slika 13: Višine ČR vitega črevesa pri 12-ih živalih, žrtvovanih 5. ali 20. dan poskusa	40
Slika 14: Višine ČR vzdolž tankega črevesa posameznega pujska na 5. dan poskusa	41
Slika 15: Padanje višin resic vzdolž tankega črevesa na 20. dan poskusa	42
Slika 16: Povezava med telesno maso in višino resic dvanajstnika	43
Slika 17: Povezava med telesno maso in višino resic teščega črevesa	44
Slika 18: Povezava med telesno maso in višino resic vitega črevesa	45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Lb	Lactobacillus
SD	standardni odklon
ČR	črevesne resice
B.	Bifidobacterium
MKB	mlečnokislinske bakterije
Ke	kolonijske enote
ČS	črevesna sluznica

1 UVOD

Mlečnokislinske bakterije (MKB) tradicionalno uporabljajo pri pripravi fermentiranih živil in napitkov. Zaradi njihovega koristnega delovanja na ravnotežje črevesne mikroflore v zadnjih tridesetih letih intenzivno proučujejo možnosti uporabe teh bakterij tudi v terapevtske namene, v obliki probiotičnih pripravkov. Pojem probiotik označuje eno ali več kultur živih mikroorganizmov, ki po zaužitju v prebavilih ljudi ali živali delujejo koristno in izboljšujejo lastnosti avtohtone mikroflore prebavnega trakta gostitelja (Huis in't Veld in Havenaar, 1993).

Pogosta uporaba antibiotikov, ki se je začela že v 50-ih letih 20. stoletja, je pripeljala do širjenja antibiotične rezistence in do kroničnih motenj črevesne mikroflore ob antibiotičnih terapijah. To je dodatno spodbudilo razvoj probiotičnega koncepta, ki ponuja naraven način vzpostavljanja in ohranjanja ravnotežja črevesne mikroflore. Probiotike lahko uporabljamo v obliki liofiliziranih ali sušenih pripravkov ali pa jih dodajamo fermentiranim, najpogosteje mlečnim izdelkom. Te proizvode imenujemo tudi »funkcionalna živila«. Pojem so uvedli v poznih 20-ih letih 20. stoletja na Japonskem, nanaša pa se na »živila obogatena s specifičnimi sestavinami, ki imajo koristen učinek na zdravje ljudi« (Food for Specified Health Use - FOSHU) (Sanders in Huis in't Veld, 1999).

Da bi se lahko nek mikroorganizem uporabil v humani ali živalski prehrani kot probiotik, mora zadovoljiti strogim probiotičnim kriterijem (Kullen in Klaenhammer, 1999). Glavni kriterij pri izbiri je sposobnost preživetja v prebavnem traktu, kjer ustvarjajo ovire nizek pH želodca, encimi prebavnega trakta in žolčne soli v tankem črevesju (Baynes in Dominiczak, 1999; Grill in sod., 2000). Svojo probiotično aktivnost pa lahko sevi izkažejo le, če imajo sposobnost pripenjanja (adhezije) in vsaj začasne naselitve v prebavilih gostitelja (Rojas in Conway, 1996). Poleg naštetih lastnosti mora biti bakterijski sev sposoben tekmovalja z obstoječo mikrofloro za hranljive snovi, atmosferske potrebe in mesta pripenjanja na črevesni epitelij. Zelo pomemben je antagonističen odnos s patogenimi mikroorganizmi, ki omogoča zaščito pred infekcijami. Ohranjanje dobrega zdravstvenega stanja živali predstavlja z živinorejskega stališča velik finančni prihranek.

Probiotični mikroorganizmi so tako bakterije kot tudi kvasovke. Pogosto vsebujejo probiotični pripravki mešanico različnih mikroorganizmov. Najpogosteje kot probiotike srečujemo mlečnokislinske bakterije in bifidobakterije, saj so te bakterije običajni prebivalci prebavil ljudi in živali.

Probiotiki so si uspešno utrli pot tudi na področje živalske prehrane. Tako danes obstaja cela vrsta bakterijskih pripravkov, ki so na voljo kot krmni dodatki. Najbolj so se uveljavili v sodobnih intenzivnih rejah perutnine in prašičev, kjer je ekonomika reje tesno povezana z zdravstvenim stanjem živali. Pri intenzivni prašičereji se prašiče odstavlja pri starosti 3 do 4 tedne. Tako dosežemo več gnezd na svinjo letno, posledično več pujskov na leto, v končni fazi pa večji dobiček. Zgodnje odstavljanje pa prašičem povzroči stres, ki se odraža v zmanjšani ješčnosti in v pogostih zdravstvenih motnjah, med katerimi je na prvem mestu driska. Omenjene težave lahko v največji meri omilimo z ustrezno prehrano, ki mora biti kakovostna in ustrezati vsem normativom za odstavljene prašiče. Poleg ustrezne krme imajo v prehrani pomembno vlogo tudi krmni dodatki. Z njimi zaviramo razvoj bolezni ali

izboljšujemo zdravstveno stanje živali, s tem pa tudi njihove proizvodne lastnosti (Salobir K. in Salobir J., 1995).

Trend razvoja probiotikov pa ni usmerjen le k prehranskim dodatkom, temveč se vse bolj usmerja tudi k terapevtski uporabi. Za uveljavljanje uporabe probiotikov pa je predpogoj dobro poznavanje avtohtone mikroflore. Eno najperspektivnejših področij za nadaljnji razvoj probiotikov je raziskovanje sprememb v gastrointestinalnem traktu, ki jih povzroči njihovo uživanje (Kos, 2001).

Na Katedri za mlekarstvo Biotehniške fakultete so iz blata dojenčkov izolirali seva *Lactobacillus gasseri* LF221 in K7, ki imata probiotične lastnosti. Poleg raziskav *in vitro* so predhodno že izvedli poskus na odstavljenih pujskih, ki je pokazal, da seva preživita prehod skozi prebavila, pokazali pa so se tudi pozitivni trendi pri priraščanju in izkoriščanju krme (Bogovič Matijašić in Rogelj, 2000; Bogovič Matijašić in sod., 2004)). Ker je iz literature znano, da stresno stanje živali po odstavitvi pogosto povzroči manjše uživanje krme in posledično spremenjene morfološke lastnosti črevesnih resic (Pluske in sod., 1997), nas je zanimalo ali omenjena seva lahko preprečita ali vsaj omilita ta fenomen.

Namen našega dela je bil zato ugotoviti ali imata omenjena seva tudi sposobnost pripenjanja na črevesno sluznico pujskov, ali vplivata na morfometrične parametre črevesnih resic in na sestavo mikrobne združbe sluznice tankega črevesa ter če obstaja povezava med parametri črevesnih resic in ravnimi parametri.

Postavili smo si sledeči hipotezi:

Na osnovi predhodnih raziskav, ki so pokazale prisotnost probiotičnih sevov K7 in LF221 v blatu živali še nekaj dni po prenehanju aplikacije sevov, smo pričakovali, da imata seva sposobnost pripenjanja na črevesno sluznico prašičev.

Predvidevali smo, da bi se učinki probiotičnih sevov lahko odražali v morfologiji resic tankega črevesa in posredno priraščanju.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROBIOTIKI

2.1.1 Definicija probiotikov

Pojem "probiotik" (iz grščine "za življenje") je leta 1974 uvedel Parker in z njim poimenoval krmne dodatke, namenjene izboljšanju rasti živali (hote je pri tem posnemal antonimno besedo "antibiotik"). Pojem je definiral kot "organizmi ali snovi, ki pripomorejo k mikrobnemu ravnotežju" (Fuller, 1997).

Fuller (1999) je kasneje dopolnil to definicijo sledeče: "živ mikrobn krmni dodatek, ki ugodno vpliva na gostiteljsko žival tako, da izboljša njeno mikrobo ravnotežje". Fuller je želel poudariti, da gre za žive mikroorganizme, zato je izločil besedo snov, ki bi sicer lahko vključevala npr. tudi antibiotike (Nekrep, 2003).

Gilliland in Walker (1990) sta definirala probiotike kot izbrane mikroorganizme, sposobne za življenje, ki imajo potencial za izboljšanje zdravstvenega stanja in prehrane človeka ali živali po zaužitju.

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). Pomembno pa je, da je učinke mogoče znanstveno dokazati.

2.1.2 Zgodovina raziskav probiotikov

Uživanje fermentiranih mlečnih izdelkov je bilo zabeleženo že v predbiblijskih časih, probiotični koncept kot takšen pa je nastal ob koncu prejšnjega stoletja z delom Metchnikoffa na Pasteurjevem inštitutu v Parizu (Fuller, 1997). Metchnikoff se je zanimal za procese staranja. Osredotočil se je na črevesno mikrofloro kot vir zastrupljanja (Tannock, 2002). Po Metchnikoffu je mikroba združba, ki se nahaja v človeškem debelem črevesu, vir strupenih snovi za gostiteljev živčni in krvožilni sistem. Črevesne bakterije so bile tako označene kot vir samozastrupljanja (Metchnikoff, 1907, cit. po Tannock, 2002). Takrat je bilo že znano, da kislo mleko ugodno vpliva na človeško prebavo. Metchnikoff je izoliral mikroorganizme iz kislega mleka in jih označil za koristne (Fuller, 1999). Uživanje kultur fermentativnih bakterij naj bi omogočilo naselitev koristnih bakterij v prebavni trakt. Mlečnokislinske bakterije so se zdele najprimernejše, saj je bilo ugotovljeno, da naravna fermentacija mleka s temi mikroorganizmi preprečuje razvoj za kislino občutljivih bakterij, vključno proteolitičnih vrst (Metchnikoff, 1907, cit. po Tannock, 2002).

Takrat je veljalo, da je sestavo črevesne mikroflore mogoče z lahkoto spreminjati z uživanjem bakterij v hrani. Opis mikroflore pa je bil vse do 1960. leta zelo pomanjkljiv (Tannock, 2002). Rettger (1935, cit. po Tannock, 2002) je navajal klostridije, laktobacile, enterokoke in vrsto *Escherichia coli* kot številčno prevladujoče bakterije v blatu.

Leta 1968 je King ugotovil občutno spodbujanje rasti prašičev z dodajanjem bakterij vrste *Lactobacillus acidophilus* v prehrano prašičev (Tannock, 2002). Dodatna spodbuda za uporabo probiotikov pri domačih živalih so bila odkritja, povezana z negativnimi vplivi antibiotikov, in priporočila, ki so prišla leta 1969 s strani takoimenovanega „Swann Committeeja“, da se uporaba antibiotikov v živalski krmi omeji na tiste, ki niso v uporabi v terapevtske namene (Tannock, 2002). Tu se je pojavila niša za probiotike. Reakcije proti uporabi antibiotikov so temeljile na pojavljanju stranskih učinkov antibiotikov, kot je driska. Poleg tega pa so tedaj opazili, da lahko antibiotiki pospešijo kolonizacijo salmonele v kokošjih prebavilih in s tem posredno ogrožajo zdravje ljudi. Podpora probiotikom je prišla tudi s strani lobija proti aditivom, ki je videl antibiotike kot tujo snov, ki ne sme biti prisotna v prehranski verigi. Z druge strani pa so imeli probiotiki prednost zaradi dejstva, da so to mikroorganizmi, ki so vključeni v prehrano že leta, pa vendar ni poznanih negativnih učinkov.

Pomembno odkritje je bilo objavljeno leta 1973, ko sta Nurmi in Rantala komaj izvaljene piščance zaščitila pred kolonizacijo črevesa s salmonelo z dodajanjem suspenzije črevesne vsebine zdravih piščancev (Fuller, 1999).

Uporaba probiotikov je sedaj vsestransko sprejeta in številne skupine znanstvenikov po svetu poskušajo odkriti mikroorganizme, ki kažejo različne funkcionalne učinke, in pripraviti mešanice definiranih vrst mikroorganizmov, ki bodo učinkovale tudi v črevesju (Fuller, 1999).

2.1.3 Probiotični mikroorganizmi

Primarne bakterijske vrste, ki so jih omenjali kot probiotike, so bile *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* in bifidobakterije. Novejše taksonomske študije pa so pokazale, da so se pod imenoma *L. acidophilus* in *L. casei* v resnici skrivale različne bakterijske vrste. Na podlagi taksonomskih študij so uvedli nekaj novih vrst, ki jih zajemata omenjeni skupini laktobacilov. Drugi dve vrsti laktobacilov, med katerimi najdemo mnoge komercialne probiotične seve, sta *Lactobacillus reuteri* in *Lactobacillus plantarum*. Bifidobakterije, ki jih srečamo kot probiotike, pa pripadajo vrstam *B. lactis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* in *B. infantis* (Holzapfel in sod., 1998).

Preglednica 1: Vrste laktobacilov in bifidobakterij, najpogostejši probiotiki (Holzpfel in sod., 1998)

Skupina: <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Druge vrste laktobacilov
<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. amylovorus</i> <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. plantarum</i>
Skupina: <i>Lactobacillus casei</i>	Vrste rodu <i>Bifidobacterium</i>
<i>Lb. casei</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i> <i>B. longum</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i>

Da nek mikroorganizem lahko uporablja kot probiotik, mora izpopolnjevati zelo stroge kriterije. Glavni izbirni kriterij je preživetje v prebavnem traktu, kjer ustvarjajo prepreke kislost želodčnega soka, prebavni encimi in žolčne soli v tankem črevesju. Odpornost proti žolčnim solem je pogosto povezana s hidrolazno (dekonjugacijsko) in steroid-7-dehidroksilazno aktivnostjo bakterijskih sevov. Metabolizem žolčnih soli pa je v neposredni povezavi z metabolizmom holesterola. Možnost hipoholesteroličnega delovanja probiotičnih sevov je dodatna željena lastnost, kajti povišana koncentracija holesterola v krvi povzroča hiperholesterolemijo, ki je eden od glavnih dejavnikov nevarnosti bolezni srca in ožilja (Bayes in Dominiczak, 1999; Grill in sod., 2000).

2.1.3.1 Mlečnokislinske bakterije kot probiotiki

Mnoge od pozitivnih lastnosti mikroflore prebavil pripisujejo mlečnokislinskim bakterijam, natančneje posameznim bakterijskim sevom, ki v glavnem pripadajo rodovoma *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Željeno delovanje mlečnokislinskih bakterij na zdravje človeka zajema predvsem antagonistično delovanje proti patogenim mikroorganizmom, izboljšanje metabolizma laktoze, stimulacijo imunskega sistema, protikancerogeno delovanje in zniževanje koncentracije holesterola v serumu (Sanders in Huis in't Veld, 1999).

2.1.3.2 Lastnosti mlečnokislinskih bakterij

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so po Gramu pozitivne, nesporulirajoče mikroaerofilne ali fakultativno anaerobne bakterije, katerih glavni produkt fermentacije je mlečna kislina. Med MKB najdemo kokoidne (*Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) in paličaste (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*) bakterije. Čeprav rod *Bifidobacterium* pogosto opisujejo kot MKB, pa taksonomsko bifidobakterije spadajo v drugi pododdelek eubakterij imenovan *Actinomycetes* (De Vuyst in Vandamme, 1994). Mlečnokislinske bakterije najdemo v različnih ekosistemih. Osamimo jih lahko iz fermentiranih živil (meso, zelenjava, sadje,

pijače ter mleko in mlečni izdelki), silaž, rastlinskega materiala, naseljujejo pa tudi dihalni, prebavni in genitalni trakt ljudi in živali. Mlečnokislinske bakterije so industrijsko pomembni organizmi zaradi sposobnosti fermentacije in terapevtsko prehranskih učinkov.

2.1.3.3 Rod *Lactobacillus*

Po klasičnih fenotipskih značilnostih so bakterije rodu *Lactobacillus* razdeljene v tri osnovne skupine glede na pot fermentacije heksoz: homofermentativne, fakultativno heterofermentativne in obvezno heterofermentativne. Modernejše molekularne metode so prinesle novo razdelitev rodu *Lactobacillus*, saj se posamezne fenotipsko zelo podobne bakterijske vrste taksonomsko zelo razlikujejo (Tannock, 1999). Sodobna identifikacija posameznih sevov temelji na ugotavljanju in primerjanju zaporedja nukleotidov 16S rRNA gena (rDNA) oziroma na za posamezno vrsto specifični reakciji verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) (Neefs in sod., 1993).

2.1.4 Lastnosti, pomembne za učinkovitost probiotikov

Da lahko probiotični sevi izrazijo svojo aktivnost je pomembno, da imajo sposobnost vezave na črevesno sluznico in vsaj začasne kolonizacije v prebavnem traktu gostitelja. Čeprav mehanizmi adhezije niso popolnoma raziskani je znano, da gre za specifične in nespecifične interakcije (Lee, 2004).

2.1.4.1 Sposobnost pripenjanja (adhezije)

Ena od lastnosti, ki jo uporabljajo pri selekciji probiotičnih kultur, je sposobnost pripenjanja na epitelne celice sluznice črevesa ljudi oziroma živali. Preskušanje sposobnosti adhezije *in vitro* poteka na različnih epitelnih celicah v tkivnih kulturah (Caco-2, HT-29) ali na drugih modelih, kot je sveže odvzeto tkivo iz črevesa živali (Bogovič Matijašić in sod., 2006), črevesna sluz (Ouwehand in sod., 1999), resuspendirani enterociti (Spencer in Chesson, 1994) ali tkivne rezine (Vesterlund in sod., 2005). Ugotovljena je bila velika korelacija med *in vivo* ter *in vitro* rezultati pri adheziji različnih sevov bifidobakterij (Crociani, 1995, cit. po Fuller, 1997). Prevladuje mnenje, da je sposobnost adhezije *in vitro* predpogoj za uspešno vezavo v črevesu in pomemben selekcijski kriterij, čeprav ugodni rezultati, pridobljeni na različnih modelih *in vitro*, še niso zagotovilo za dejansko vezavo *in vivo*. Vseeno pa sposobnost pripenjanja ni edina pomembna lastnost uspešnega probiotičnega organizma. Hitra rast in sposobnost preživetja sta pri tem enako pomembni lastnosti (Fuller, 1999).

2.1.4.2 Sposobnost naselitve

Na bakterijsko kolonizacijo v prebavnem traktu vplivajo različni zunanji in notranji dejavniki: starost in zdravstveno stanje gostitelja, prehrana, odpornost, vpliv eventualne medicinske terapije, črevesna peristaltika in sestava avtohtone mikrobne populacije (Gibson in sod., 1997).

Sposobnost kolonizacije je tesno povezana s preživetjem in ohranitvijo organizmov v prebavilih. V splošnem velja, da je kolonizacija v prebavilih lažje dosežena, če vnešeni

organizem izvira iz prebavil, še posebej iz prebavil iste vrste živali (Fuller, 1978, cit. po Fuller, 1997). Niso pa redki primeri, ko so se za učinkovite probiotike pokazali tudi organizmi, ki niso izvirali iz prebavil. Primer so tudi spore rodu *Bacillus*, ki so zelo razširjene v probiotičnih pripravkih, čeprav niso tipični prebivalci črevesja (Fuller, 1997). Pomembna dejavnika za čim boljše preživetje zaužitih mikroorganizmov v prebavilih sta vezava na površino epitelnih celic in odpornost proti kislinam. Običajno le neprekinjeno uživanje posameznega probiotika zagotavlja njegovo zadrževanje v prebavilih. Vsekakor pa uporaba organizmov, ki so v simbiotičnem odnosu z gostiteljem, omogoči boljše preživetje in ohranitev le-teh v prebavilih. Raziskave kažejo, da so se posamezni sevi mikroorganizmov sposobni v prebavilih ohraniti v velikem številu tudi daljše obdobje (Fuller, 1997).

2.1.4.3 Protimikrobno delovanje

Glede na metabolite, ki jih proizvajajo posamezni organizmi, ločimo baktericidno in bakteriostatično delovanje probiotičnih bakterij.

Inhibicijo nezaželenih mikroorganizmov v prebavnem traktu omogoča izločanje vrste protimikrobnih snovi. Najpomembnejši primarni metaboliti s takimi lastnostmi so mlečna kislina, očetna kislina, diacetil, acetaldehid, vodikov peroksid in bakteriocini (proteinske snovi z protimikrobnim delovanjem, v prvi vrsti proti sorodnim bakterijskim vrstam) (Huis in't Veld in Havenaar, 1993).

2.1.5 Probiotični proizvodi

Probiotiki za humano uporabo so na tržišču na voljo v glavnem v dveh oblikah:

- kot sestavni del živila, najpogosteje v fermentiranih mlečnih izdelkih (mleko, sir, jogurt). Za njih v promociji ne smemo trditi, da imajo zdravilen učinek;
- kot pripravki koncentriranih in stabiliziranih mikroorganizmov v obliki praškov, kapsul ali tablet. Če so naprodaj kot zdravila brez recepta (OTC), zanje veljajo zahteve za registracijo kot za zdravila (Nekrep, 2004). Večina pa jih je na voljo kot prehranski dodatki.

Probiotični izdelki za živali so lahko v obliki tablet, praškov, sprejev, past ter tekočin, vsebujejo pa lahko en organizem ali več različnih vrst (Fuller, 1997). Uvrščajo jih v kategorijo krmnih dodatkov, posamezni izdelki pa so na voljo tudi za terapijo.

Za uporabo probiotikov kot krmnih dodatkov za živali v reji velja, da sta izbira vrste in doziranje odvisno od vrste živali, starosti, zdravstvenega stanja in drugih vplivov. Bakterijski probiotiki so učinkoviti pri prašičih, perutnini in teletih, probiotiki, ki vsebujejo kvasovke, pa so pokazali boljše rezultate pri odraslem govedu (Fuller, 1999). Zdi se, da se bosta v bodoče živilska in farmacevtska industrija tesneje povezali, saj probiotike uvrščamo nekje med živila/prehranske ali krmne dodatke in zdravila. Večja farmacevtska podjetja so že spoznala potencial na tem področju. Intenzivne raziskave na področju nekaterih kroničnih obolenj, kot so kronična vnetja črevesja, alergije in druga, so pokazale,

da bi bilo aplikacijo probiotikov mogoče razširiti na področje zdravljenja (Reid, 2004). Seveda pa je potrebno ločevati probiotike za funkcionalna živila ali prehranske dodatke od tistih za terapevtske namene, ki jih nekateri imenujejo bioterapevtiki (Reid, 1999).

2.1.5.1 Mleko in mlečni izdelki kot medij za prenos probiotičnih organizmov

Uživanje bakterij v obliki mlečnih proizvodov se je uveljavljalo že pred več stoletji, posebej v Evropi in Aziji. Že paleolitska prehrana je vključevala velike količine nepatogenih mikrobov (Reid, 2004).

Sveže fermentirano mleko in jogurt, ki jim na začetku ali ob koncu procesa fermentacije dodajo probiotične organizme, sta najobičajnejša nosilca probiotikov. Ti proizvodi so med potrošniki priljubljeni in predstavljajo okusen prehranski dodatek, ki prispeva biološko aktivno zdravstveno podporo (Sanders in Huis in't Veld, 1999).

Število vrst probiotičnih proizvodov se povečuje, vključuje pa sire, sladolede, zamrznjene jogurte pa tudi hrano in napitke, ki niso na mlečni osnovi (Gardiner in sod., 1998, cit. po Reid, 2004; Stanton in sod., 1998, cit. po Reid, 2004).

Preglednica 2: Seznam bolj razširjenih probiotičnih organizmov, ki jih uporabljajo za mlečne proizvode (fermentirani napitki, sir in mleko) (Sanders in Huis in't Veld, 1999)

Probiotični mikroorganizem	Proizvajalec
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFMTM	Rhodia, Madison, WI, ZDA
<i>Lb. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Lincoln, ZDA
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Valio, Finska
<i>Lb. reuteri</i> SD2112	McNeil Consumers, ZDA
<i>Lb. casei</i> Shirota	Yakult, Tokio, Japonska
<i>Lb. casei</i> DN114 001	Dannon, Pariz, Francija
<i>Lb. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech, London, Canada
<i>Lb. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech, London, Canada
<i>Lb. johnsonii</i> LA1	Nestle, Lausanne, Švica
<i>Lb. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Product Co., Tokyo, Japonska
<i>Lb. paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen, Milwaukee, ZDA
<i>Lb. plantarum</i> 299V	Probi, Lund, Švedska
<i>Lb. rhamnosus</i> LB21	Essum AB, Umea, Švedska
<i>Lb. salivarius</i> UCC118	University College Cork, Irska
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Copenhagen, Danska
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co., Zama-City, Japonska
<i>B. longum</i> SBT-2928	Snow Brand Milk Products Co., Tokyo, Japonska
<i>Lb. rhamnosus</i> DR20	New Zealand Dairy Board, Palmerston North, Nova Zelandija

Komercializacija in distribucija proizvodov širši populaciji se pospešeno odvija zadnjih 50 let. To zahteva vse več znanstvenih raziskav s področja selekcije primernih sevov, odkrivanja mehanizmov delovanja le-teh ter kliničnih dokazov o pozitivnih zdravstvenih učinkih na gostitelja (Reid, 2004).

Medtem ko so tradicionalne starterske kulture v industriji mlečnih izdelkov selekcionirane glede na sposobnost proizvodnje različnih metabolitov, ki prispevajo k željenim organoleptičnim lastnostim, morajo biti probiotični mikroorganizmi selekcionirani glede na sposobnost zagotavljanja specifičnih koristnih zdravstvenih oz. prehranskih učinkov v človeškem organizmu. V preteklosti temu niso posvečali potrebne pozornosti, saj so proizvajalci premalo preverjene seve dodajali izključno iz komercialnih nagibov. Zato smo lahko na trgu v zadnjih letih našli veliko probiotičnih kultur s pomankljivo identifikacijo sevov in brez znanstvenih dokazov o njihovi učinkovitosti. Trenutno številne skupine intenzivno oblikujejo osnove za evropsko zakonodajo za to področje.

Primer enega prvih probiotikov, za katerega je bila opravljena vrsta znanstvenih raziskav, je *L. casei* Shirota, ki ga proizvajalec Yakult v obliki napitka na bazi sirotke prodaja že vrsto let na Japonskem, v zadnjih letih pa tudi drugje po svetu. Podjetje je doseglo velik uspeh s proizvodom, saj ga vsak dan zaužije 24 milijonov ljudi (Reid, 2004).

Druga dva razširjena probiotika sta *Lb. rhamnosus* GR-1, ki je bil izoliran 1982. leta, ter *Lb. rhamnosus* GG. Licenco za uporabo seva GG ima največje finsko mlečno-predelovalno podjetje Valio, ki vsa leta veliko vlaga v raziskave in dobro sodeluje z akademskimi raziskovalnimi skupinami. Omenjeni organizem vsebujejo številni proizvodi, ki se prodajajo v 28-ih državah. Sev GR-1 ima poleg običajne uporabe, katere cilj je črevo, dobre možnosti za uporabo na področju urogenitalnih infekcij (Reid, 2004).

Svensson (1999) navaja, da veliko probiotičnih sevov, še posebej bifidobakterij, ne raste dobro v mleku. Mleko in mlečni izdelki pa so odličen medij za prenos probiotičnih mikroorganizmov, saj mlečni proteini opravljajo funkcijo zaščite probiotičnih bakterij pri prehodu skozi želodec (Charteris in sod, 1998, cit. po Gilliland, 2004). Večina probiotičnih bakterij lahko tudi uporabi laktozo iz mleka kot vir energije za rast v prebavnem traktu. Probiotične bakterije so lahko vključene v startersko kulturo ali jih dodajajo pasteriziranemu mleku ali že fermentiranim mlečnim izdelkom.

V ZDA je razširjen mlečni proizvod, označen kot nefermentirano acidofilno mleko, ki vsebuje žive celice *Lb. acidophilus*, dodane sveže pasteriziranemu mleku. Mleko mora biti shranjeno pri nizkih temperaturah, da se probiotične bakterije v njem ne razmnožujejo več. V tem primeru mleko s svojim puferskim učinkovanjem služi le kot medij za prenos mikroorganizmov (Gilliland, 2004).

Najpogosteje pa so probiotiki na voljo v obliki fermentiranih mlečnih napitkov. Tradicionalne starterske kulture za proizvodnjo jogurtov so vključevale *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Gilliland, 2004). Probiotični jogurti pa teh dveh sevov včasih sploh ne vsebujejo, pač pa druge vrste, kot so *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, bifidobakterije in druge. Primeren nosilec je lahko tudi sir, ki je manj kisel in dobro zaščiti bakterije med prehodom skozi prebavila (Perko in sod., 2002).

2.1.6 Zakonodaja na področju probiotikov

Zakonodaja, ki se za probiotike šele oblikuje, bo povečala varnost in zagotovila, da bosta označba in promocija jasno sporočali lastnosti in vplive proizvoda na zdravje (Reid, 2004). Evropska komisija šele oblikuje smernice za zakonodajo na področju probiotikov in funkcionalne hrane. Sicer se zakonodaja razlikuje od države do države, v nekaterih državah EU že imajo zakone za to področje: Švedska od leta 1990, Nizozemska od leta 1998 in Velika Britanija od leta 2000. Eden pomembnejših dokumentov so smernice za ovrednotenje probiotikov v hrani, ki jih je izdala skupna delovna skupina FAO/WHO leta 2002 (FAO/WHO, 2002).

Skupne delovne skupine organizacij FAO, IDF in ISO si tudi prizadevajo oblikovati primerne standardne metode za kontrolo probiotikov.

Zanimivo je, da je področje uporabe probiotikov kot krmnih dodatkov za živalsko prehrano veliko bolje urejeno kot področje probiotikov za ljudi. Uredba EU 1831/2003 (uvršča probiotične mikroorganizme v kategorijo krmnih dodatkov, znotraj te pa v funkcionalno skupino stabilizatorjev črevesne flore. Predpisano je tudi označevanje, ki vključuje rok trajanja, način uporabe, identifikacijsko številko seva in število kolonijskih enot v gramu (ke/g). V EU je trenutno na seznamu krmnih dodatkov registriranih probiotikov za krmila 29 mikroorganizmov. Tisti, ki želijo uvesti na trg nov probiotični mikroorganizem, morajo predložiti ustreznim organom Evropske komisije v presojo obširno dokumentacijo, ki obsega tako varnost kot učinkovitost seva (Zakon o krmi, 2006).

2.1.7 Vplivi probiotikov

2.1.7.1 Pozitivni vplivi probiotikov na gostitelja

Preglednica 3 prikazuje, kakšni so pričakovani učinki probiotikov na gostitelja – žival, čeprav za vse učinke še ni dovolj trdnih znanstvenih dokazov.

Preglednica 3: Potencialni ugodni učinki probiotikov pri farmskih živalih

Večja odpornost proti infekcijskim boleznim
Povečanje prirasta
Izboljšan izkoristek krme
Izboljšana prebava
Boljša absorbcija hranil
Zagotavljanje esencialnih hranil
Izboljšanje kakovosti mleka
Povečanje produkcije mleka
Povečanje produkcije jajc
Izboljšanje kakovosti jajc
Izboljšanje kakovosti klavnih polovic in manjša kontaminacija

2.1.7.2 Možni negativni stranski učinki probiotikov

Podatkov, ki kažejo, da so probiotiki varni za uporabo in da jih človeški ali živalski organizem dobro prenaša, je veliko (Naidu in sod., 1999, cit. po Reid, 2004). To pa še ne pomeni, da do infekcij ne more priti, saj so ugotovili posamezne primere infekcij z mlečnokislinskimi bakterijami (Reid, 2004). Takšne infekcije so odkrili pri ljudeh s prizadetimi funkcijami črevesne sluznice, ki postane prepustna, oziroma pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom. V Evropski skupnosti intenzivno oblikujejo smernice za zagotavljanje varnosti, ki bodo vsebovale priporočene teste, ki jih bo potrebno opraviti za vsak probiotični sev na tržišču.

Posebej je treba obravnavati gensko spremenjene probiotične mikroorganizme, katerih uporaba v Evropi zaenkrat še ni dovoljena.

2.2 PREBAVNI TRAKT

Kompleksnost prebavnega trakta se razlikuje med vrstami živali in znotraj posameznih prebavil ter je odvisna od zdravstvenega stanja posamezne živali. Ključno pri prebavi je učinkovita absorpcija hranil skozi steno prebavil. Hidroliza in fermentacija sta pri tem mehanizma, ki pretvorita hrano v obliko, primerno za absorpcijo.

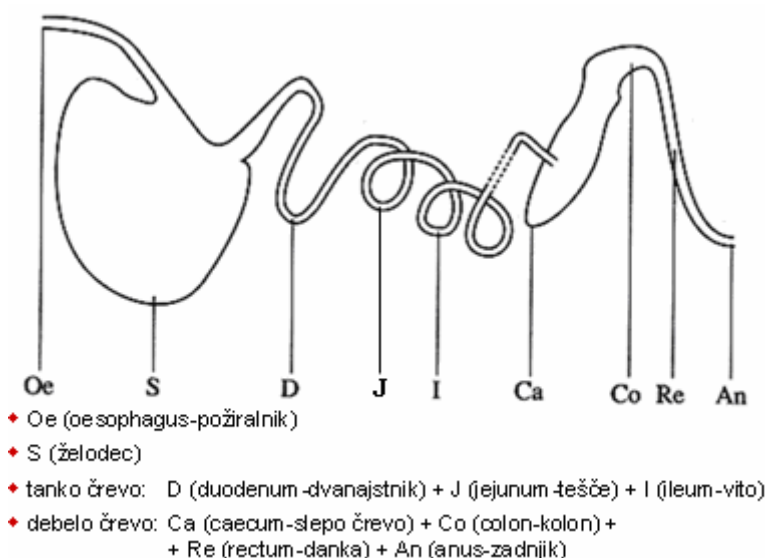
Človek, prašič in perutnina so neprežvekovalci, imajo enodelni želodec in so relativno manj odvisni od simbiotičnega razmerja med mikrobovno floro in gastrointestinalnim traktom, kot so živali z vampom (sestavljeno želodcem). Mikrobovna populacija prebavil neprežvekovalcev se nahaja mnogo nižje v prebavnem traktu kot pri prežvekovalcih, zato za razgradnjo neprebavljivih snovi hrane ne fermentirajo v tolikšni meri. Manj številčna mikroflora v primerjavi s prežvekovalci pomeni bolj omejeno sposobnost prebave in posledično večje potrebe po hranilih v prehrani takih živali. Krma z veliko celuloze, lignina in strukturnih ogljikovih hidratov je za monogastrične živali neustrezna, saj so za pokrivanje potreb po aminokislinah in vitaminih odvisni od prehrane (Ewing in Cole, 1994).

Pri prežvekovalcih pa je mikrobovna fermentacija v prebavnem traktu intenzivnejša. Ta se odvija v vampu, pred prebavo v tankem in debelem črevesu. Prežvekovalci imajo sposobnost pridobivanja aminokislin in večino vitaminov preko mikrobnega delovanja oziroma reakcij z dušikovimi in ogljikovimi viri. Za razliko od prašičev in perutnine imajo prebavne encime, ki omogočajo razgradnjo strukturnih ogljikovih hidratov (Ewing in Cole, 1994).

Prebavni trakt sesalcev predstavlja dinamičen ekosistem, ki vsebuje kompleksno združbo mikroaerofilnih in anaerobnih mikrobov, ki so udeleženi pri fermentativnem izkoriščanju zaužite hrane in snovi, ki jih gostitelj izloča v prebavni trakt in imajo bistveno vlogo pri ustvarjanju pogojev, pomembnih za zdravje gostitelja (Konstantinov in sod., 2002). Poznavanje strukture in funkcije mikrobnih združb in aktivnost posameznih mikrobnih vrst v tem ekosistemu je tako nujno za razvoj funkcionalnih prehranskih dodatkov, kot so probiotiki in prebiotiki.

2.2.1 Zgradba prebavnega trakta monogastričnih živali

Vpliv posameznih prebavnih organov na prebavo se med živalskimi vrstami razlikuje, saj imajo različno encimsko in presnovno funkcijo.



Slika 1: Prebavni trakt prašiča (prirejeno po McDonald in sod., 2002)

2.2.1.1 Usta

V ustih se odvija predvsem mehanski proces žvečenja. Slina vsebuje mucin, vodo in pri človeku ter nekaterih rastlinojedih živalih še amilazo, ki katalizira razgradnjo škroba v maltozo. Slino izloča žleza slinavka in ima na hrano učinek maziva.

2.2.1.2 Želodec

Želodec je razširjen del prebavnega trakta, specializiran za začetek encimatske in hidrolitične razgradnje hrane (Dellmann in Eurell, 1998).

Želodec prašiča je enodelen, vrečast organ ki ima funkcijo prebave in skladiščenja (Černe, 1996). Pri odraslem prašiču ima volumen 8-ih litrov. V njem je zelo nizka vrednost pH (približno 2), ki je sicer nujna za proteolizo, obenem pa negativno vpliva na mikrobno aktivnost.

Vrednost pH želodca je v obratnem sorazmerju z bakterijsko zastopanostjo. Ko je koncentracija mikrobov visoka, se poveča fermentacija v lumnu, gastrična prebava pa se zato odvija kasneje. Želodec prašiča je organ, ki ga sestavlja enoten prostor. Deli se na 4 glavne predele (ezofagalnega, kardialnega, fundusnega in pilorusnega), ki so značilni tudi za ostale monogastrične sesalce. Vsaka vrsta pa ima drugačno strukturo, okoljske razmere ter posledično različno mikrobno sestavo in poseljenost. Ezofagalna regija, ki sledi požiralniku, nima žleznih izločkov, kot jih imajo ostale želodčne regije. Na prebavo v tem zgornjem delu želodca ne vplivajo prebavni sokovi, proizvedeni v spodnjem delu organa.

To zagotavlja primerno vrednost pH, vlago, temperaturo in substrate za razvoj mikrobnе populacije in fermentacijo. Obseg fermentacije je odvisen tudi od sestave zaužite hrane (Ewing in Cole, 1994). S pomikanjem hrane proti fundusni regiji se pH niža, mikrobnа aktivnost se zmanjšuje, aktivnost pepsina pa se povečuje (Ewing in Cole, 1994). Površina želodca je poseljena z mikrofloro, ki jo večinoma sestavljajo laktobacili. Ti se tu nahajajo pri živalih vseh starosti (Tannock in Smith, 1970, cit. po Ewing in Cole, 1994).

2.2.1.3 Tanko črevo

Intestinalna prebava oziroma razgradnja krme do oblike, primerne za absorbcijo, se začne, ko vsebina iz želodca pride v stik z izločki žolča ter z drugimi prebavnimi izločki in se nadaljuje vzdolž tankega črevesa (Dellmann in Eurell, 1998).

Tanko črevo je srednji del prebavnega kanala, ki se začne za pilorusno sluznico želodca in preide v debelo črevo z ustjem na meji med slepim in debelim črevesjem (Černe, 1996). Pri prašiču je lahko dolgo do 20 metrov in zavzema tretjino volumna gastrointestinalnega trakta (Ewing in Cole, 1994). Je cevast organ, sestavljen iz treh delov. Prvi del je dvanajstnik (*duodenum*), drugi, znatno daljši, je tešče črevo (*jejunum*) in tretji, kratki del, je vito črevo (*ileum*) (Černe, 1996). Tešče črevo zavzema 85% celotne dolžine organa (Ewing in Cole, 1994). Stena tankega črevesa je sestavljena iz štirih plasti (tunik): sluznice, podsluznice, mišične plasti in seroze (Ewing in Cole, 1994).

Sluznica (*tunica mucosa*) je s svojo prosto površino v stiku s črevesno vsebino in je vsrkovalna in izločevalna površina črevesja. Večkratno povečanje sluznice tankega črevesa omogočajo tri vrste gub:

1. Sluznične krožne gube (*palicae circulares*) ali Kerchringovi nabori so stalne gube sluznice in podsluznice. Glede na os črevesne cevi so večinoma spiralaste. Ob močno napolnjenem črevesu ne izginejo. Najmočnejše so v dvanajstniku, tanjše v teščem črevesu in nizke v vitem črevesu, kjer postopoma izginejo.
2. Črevesne resice (*villi intestinales*) so prstasti nabori črevesne sluznice. Pokriva jih vrhnjica, zapolnjuje pa proprija. Mišični list sluznice in podsluznica nista njihov sestavni del. Višina črevesnih resic v posameznih delih črevesa ni stalna. Višina in površina resic je največja na začetku dvanajstnika in se zmanjšuje do konca vitega črevesa. Velikost resic je različna glede na vrsto živali, starostno skupino in prehrano. Na velikost resic pa vplivajo tudi izločki želodca, trebušne slinavke in jeter, ki resicam določajo mikrookolje. Ugotovljeno je bilo, da se stres prašičev po odstavitvi odraža v tem, da se resice skrajšajo (Ewing in Cole, 1994).
3. Mikrovili so prstasti citoplazemski podaljški epitelnih celic vrhnjice. Povečujejo stično površino med celicami in črevesno vsebino, s tem pa tudi absorpcijsko površino (Černe, 1996).

Whipp navaja, da je tanko črevo novorojenega prašiča dolgo 4 m in ima povprečni premer 0,5 cm. Dolžina tankega črevesa v prvih desetih dneh življenja narašča za 0,8 cm na uro. Tako je pri 10-dnevnem prašiču površina sluznice tankega črevesa 0,94 m². Mikrovili

povečajo površino še za 30-krat, kar da skupno absorpcijsko površino tankega črevesa 114 m² pri 3 kg težkem prašiču. Forenbacher za odraslega prašiča navaja površino črevesne cevi 13 m². Resice jo povečajo za 12-krat, mikrovili pa še za 30-krat (Černe, 1996).

Hrana, ki prispe v tanko črevo, je že delno prebavljena. Ta se nato pomeša z izločki dvanajstnika, jeter in trebušne slinavke. V tankem črevesju se odvija pomemben del prebave, pri kateri so vključeni gostiteljevi encimi, v določeni meri pa še bakterijska fermentacija. Naseljuje ga mikroflora, ki postaja vzdolž tankega črevesja vse številčnejša. Tu se odvija večji del absorpcije končnih produktov prebavnih procesov. Absorpcijo pa olajša povečana površina, ki jo ustvarjajo črevesne resice (Ewing in Cole, 1994).

2.2.1.4 Debelo črevo

Debelo črevo anatomsko sestavljajo slepo črevo, kolon, rektum in anus. Sluznica debelega črevesa je zgrajena iz enakih histoloških plasti kot sluznica tankega črevesa. Njena značilnost je, da nima črevesnih resic, pač pa precej globlje črevesne žleze oziroma kriptе. Tudi skupna debelina sluznice je večja kot v tankem črevesu. Črevesne žleze izginjajo na prehodu rektalnega v analni epitel. Prebavni sok, ki ga izločajo žleze v debelem črevesu, vsebuje zelo malo ali nič encimov. Tako je kemijska presnova v svetlini debelega črevesa odvisna od bakterijske flore (Černe, 1996).

2.3 GASTROINTESTINALNA MIKROFLORA

Mikrofloro prebavnega trakta bi lahko označili kot postnatalno pridobljen »organ«, sestavljen iz zelo raznolikih bakterij, ki opravljajo pomembno funkcijo za gostitelja. Sama sestava mikroflore se lahko spreminja pod vplivi okolja. Med najpomembnejšimi dejavniki je prehrana (Blum in Schiffrin, 2002).

V prebavilih najdemo stalno (avtohtono oziroma indigeno) in prehodno (alohtono oziroma pasantno) mikrofloro. Pomembnejše učinke imajo predvsem stalni mikroorganizmi, prehodni pa le izjemoma, če so prisotni v velikem številu ali če izločajo bioaktivne snovi (toksine, inhibitorje, metabolite) (Nekrep, 2004).

Raziskave mikroorganizmov prebavnega trakta so zelo otežene zaradi anaerobnih pogojev v prebavnem traktu. Anaerobni pogoji zahtevajo posebne pripomočke in pazljivost pri rokovanju z vzorci. Raziskave so otežene tudi zaradi velike raznolikosti mikroorganizmov, pri čemer smo zelo omejeni s selektivnimi gojišči, ki so na voljo. Pomembno je upoštevati, da je čas inkubacije lahko zelo dolg (Konstantinov in sod., 2002).

Bakterije, ki jih ni mogoče gojiti, niso edini problem pri proučevanju črevesne mikroflore. Večino raziskav črevesne mikroflore so naredili na vzorcih blata. Ti vzorci pa nam ne dajo prave slike mikroflore in njene dejavnosti v črevesju (Tannock, 1999).

2.3.1 Razvoj mikroflore pri prašiču in človeku

Ob rojstvu v prebavilih prašiča praviloma ni mikroorganizmov. V prvih 24-ih urah skupno število mikroorganizmov strmo naraste, medtem ko kasneje do odstavitve spet upade. Pri sesnih pujskih prevladujejo laktobacili, razen teh pa so prisotni tudi vrsta *E. coli*, bakterije iz rodov *Bacteroides*, *Micrococcus*, *Streptococcus* ter *Clostridium* in glive. Število mikroorganizmov se od dvanajstnika do slepega črevesa povečuje, vzdolž debelega črevesa pa je koncentracija približno enaka. Med odstavljanjem število mikroorganizmov ponovno naraste, medtem ko razmerje med vrstami mikroorganizmov večinoma ostane enako, le koncentracija koliformnih bakterij se nekoliko poveča (Fuller, 1999).

Fuller (1978, cit. po Ewing in Cole, 1994) navaja, da so prevladujoče vrste pri mladih prašičih običajno *Lb. fermentum*, *Lb. salivarius* in *Streptococcus salivarius*, pri odraslih pa *Lb. acidophilus* in *Str. bovis*.

Moreau in sod. (1986, cit. po Blum in Schiffrin, 2002) navajajo, da se prva velika sprememba v sestavi mikroflore človeka zgodi takoj po rojstvu, ko je sterilni fetus izpostavljen vplivom zunanjega okolja. Poleg materinih mikroorganizmov, pridobljenih med prehodom skozi porodni kanal, z dotiki in preko dojenja, vplivajo na sestavo mikroflore novorojenca še drugi mikrobi iz okolja. Beno in sod. (1986, cit. po Blum in Schiffrin, 2002) so ugotovili, da se v obdobju dojenja prevladujoči bakterijski rodovi izmenjujejo v določenem redosledu, po prenehanju dojenja pa se postopno sestava mikroflore ustali. Ugotovili so tudi, da se sestavi mikroflore dojenih otrok in tistih, ki so uživali mlečne nadomestke, razlikujeta. Poselitev prebavil pogojujejo različne okoljske razmere. Sestava in občasna dinamika mikrobnega ekosistema v prebavilih je še precej nepojasnjena (Blum in Schiffrin, 2002). Homeostaza otežuje spreminjanje sestave črevesne mikroflore zaradi težnje ekosistemov k upiranju spremembam, kar tudi otežuje kolonizacijo mikroorganizmov, ki jih vnesemo v prebavila s hrano. Zaradi tega lahko probiotične bakterije praviloma zasledimo v blatu, dokler jih oseba uživa in še nekaj dni zatem, kasneje pa jih v blatu več ne zasledimo (Tannock, 2002).

Sestava avtohtone mikrobne združbe je skozi vse življenje gostitelja presenetljivo stabilna, kljub stalnemu stiku z okoljskimi mikroorganizmi, ki jih v organizem vnašamo pretežno s hrano (Kimura in sod., 1997, cit. po Blum in Schiffrin, 2002). Pri odraslih ljudeh so drastične spremembe v sestavi mikroflore redke. Občasne spremembe v sestavi pa so lahko posledica večjega vnosa bakterij s hrano ali pa same sestave hrane (Pochart in sod., 1992, cit. po Blum in Schiffrin, 2002). Bouhnik in sod. (1999, cit. po Blum in Schiffrin, 2002) so ugotovili povečanje števila bifidobakterij kot posledico uživanja oligosaharidov. Oligosaharide, ki jih človeški prebavni encimi ne razgradijo, fermentirajo bakterije v tankem in debelem črevesu. Tako vrsta zaužitih hranilnih snovi lahko posredno vpliva na sestavo mikroflore.

Porušeno ravnovesje je večinoma povezano z bolezenskimi stanji, kot so črevesne infekcije, terapija z antibiotiki ali oslABLJena imunska sposobnost. Pri zdravih odraslih osebkih pa je bilo opaženo pomembno zmanjšanje števila potencialno koristnih bakterij, kot so bifidobakterije, pri starejši populaciji (Hopkins in sod., 2001, cit. po Blum in Schiffrin, 2002).

2.3.2 Pomen mikroflore v prebavi prašiča

Pod evbiozo razumemo uravnotežene odnose v sestavi in številčnosti populacije mikroorganizmov v prebavilih (Černe, 1996). Velik pomen v etiopatogenezi želodčno črevesnih obolenj domačih živali imajo mikroorganizmi. S pojmom disbioza ali disbakterioza označujemo porušeno razmerje med vrstami predstavnikov normalne mikropopulacije ali prisotnost drugih patogenih mikroorganizmov. Takšne spremembe posredno ali neposredno vplivajo na fiziološke procese v prebavilih in na zgradbo sluznice in so lahko vzrok patoloških okvar (Černe, 1996).

Pri prašiču ima bakterijska flora značilno vlogo pri prebavi že v tankem črevesu. Glavni del prebave pri prašiču poteka v debelem črevesu, pri tem pa sodelujejo mikroorganizmi. Večina vrst črevesnih bakterij pri prašiču razgrajuje monosaharide (glukozo, galaktozo in fruktozo) in disaharide (laktozo, maltozo, saharozo), lastno amilazo pa vsebujejo samo nekatere vrste. Največ je ima *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Clostridium perfringens* in *Cl. butyricum*. Škrob iz koruze in kuhanega krompirja se pri prašiču večinoma prebavi že v tankem črevesu, surov škrob pa prehaja nespremenjen v slepo črevo. Tu se razgradi s pomočjo bakterij vrste *Cl. butyricum*, ki predstavljajo glavni izvor alfa-amilaze v debelem črevesu prašiča. Maltoza in maltotrioza sta substrata za delovanje laktobacilov in streptokokov, ki ju fermentirajo do mlečne kisline, iz nje pa nastanejo hlapne maščobne kisline. Ker prašič ne razpolaga z lastnimi celololitičnimi encimi, bakterijska razgradnja pomembno prispeva k prebavi hrane. Razgradnja ogljikovih hidratov, ki jo opravlja normalna črevesna flora, je pomembna za vzdrževanje črevesne evbioze oziroma pogojev za rast in razvoj mikrobne populacije (Černe, 1996).

Debelo črevo je najgostejše poseljen mikrobni ekosistem. Gram vsebine vsebuje do 10^{12} organizmov iz nabora doslej ugotovljenih 400 mikrobnih vrst. Predvsem so to striktno anaerobni mikroorganizmi. Količinsko sta pri živalih in človeku najpomembnejši skupini *Bacteroides* in bifidobakterije. Številčno prevladujejo po gramu negativne vrste rodu *Bacteroides* (npr. *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*). V tem rodu so proteolitične in saharolitične vrste (MacFarlane in Gibson, 1994).

2.3.3 Simbioza mikroflora - gostitelj

Specifičnim predstavnikom prebavne mikroflore, med katerimi so najbolj preučeni laktobacili in bifidobakterije, so pripisali številne ugodne vplive na gostitelja. Ti ugodni vplivi se odražajo v spodbujanju razvoja prebavil, antagonizmu s patogenimi mikrobi in v imunski modulaciji. Poleg teh lastnosti ima mikroflora pomembno vlogo pri ohranjanju črevesne imunske homeostaze in pri preprečevanju vnetij. Prva obramba proti patogenim bakterijam in mikrobnim antigenom poteka na nivoju črevesnih epitelnih celic. Raznolika in kompleksna mikrobna združba je v prebavilih v tesni povezavi s sluznico gostitelja (Blum in Schiffrin, 2002). Ena večjih neznank je mehanizem, kako veliko število bakterijskih celic vzdrži v zelo tesnem razmerju s protitelesi živali in ljudi, ne da bi izzvali opazno vnetno reakcijo pri gostitelju (Kimura in sod., 1997, cit. po Tannock, 2002). Mehanizme medsebojne komunikacije med bakterijami in črevesnimi celicami pa v zadnjem času intenzivno proučujejo.

2.3.4 Mikroflora in imunski sistem

Znano je, da ima mikroflora v človeških prebavilih velik vpliv na funkcije sluznice v prebavilih (Cebra, 1999, cit. po Blum in Schiffrin, 2002). Kolonizacija avtohtonih bakterij v prebavilih vpliva na fiziologijo gostitelja preko izražanja različnih genov, odgovornih za absorpcijo hranil, za imunsko obrambo in za ksenobiotični metabolizem (Hooper in sod., 2001, cit. po Blum in Schiffrin, 2002).

Epidemiološki podatki so pokazali, da je manjša izpostavljenost novorojenčkov in dojenčkov mikroorganizmom v povezavi z večjim pojavom alergijskih bolezni (Isolauri, 1997, cit. po Blum in Schiffrin, 2002). Kaže, da je mikrobno kljubovanje gostitelju pomemben predpogoj pri razvoju homeostaze imunskega sistema prebavil in ohranjanju oralne tolerance (Weiner, 1997; Blum in Schiffrin, 2002). Vse več je tudi dokazov, da odpoved tolerance do mikroflore lahko vodi do kroničnega vnetja prebavil (Duchmann in sod., 1995, cit. po Blum in Schiffrin, 2002). To nakazuje, da imunski nadzor bakterijske vsebine prebavil prispeva k:

- razvoju imunske tolerance in obvladovanju resnejših vnetnih reakcij oziroma pojavov,
- kontroli poseljevanja,
- učinkoviti obrambi proti zunanjim antigenom, patogenim bakterijam in virusom.

Interakcije med gostiteljevimi celicami in avtohtono mikrofloro oziroma mehanizmi tovrstne homeostaze so predmet številnih raziskav.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS POSKUSA

V poskusnem hlevu na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete smo opravili poskus na 24-ih pujskih. Poskus je trajal 21 dni (od 16.4. do 6.5.2002). Odstavljeni pujski so bili komercialni križanci, s povprečno težo 7.25 ± 0.40 kilogramov in povprečno starostjo 23 dni. Pujske smo naključno razdelili v tri skupine, tako da je vsaka od skupin zajemala prašiče iz dveh sosednjih kletk. V vsaki kletki, ki je imela kapljični napajalnik in krmilno korito, so bili vhlevljeni 4 prašiči. Vse živali so dobivale svežo vodo in krmo po volji (*ad libitum*). Prašiči dveh poskusnih skupin so prejeli 2 tedna enkrat dnevno po 5 ml suspenzije laktobacilov seva *Lb. gasseri* LF221 oziroma *Lb. gasseri* K7, pridobljenih iz 100 ml gojišča in resuspendiranih v fiziološki raztopini (približno 5×10^{10} ke). Prašiči tretje skupine so sestavljali kontrolno skupino. Prašiče smo stehali ob dnevih 0, 5, 13 in 19.

Glede na razlike v prirastih smo 6. in 20. dan izločili iz vsake skupine po 2 pujska (enega z najmanjšim in enega z največjim prirastom). Od izločenih, žrtvovanih pujskov, smo nato vzeli vzorce črevesja za morfometrične meritve črevesnih resic (meritve višine črevesnih resic) in mikrobiološko analizo črevesne sluznice.

Posebno pozornost smo posvečali vsakodnevnu čiščenju kletk, da bi se s tem izognili navzkrižni okužbi z bakterijami med skupinami in zmanjšali možnosti okužbe s koliformnimi bakterijami in plesnimi iz ostankov krme in iztrebkov.

Prostor je bil primerno prezračevan, osvetljen, s konstantno temperaturo, ki je bila 32 °C. Pokladano krmilo, s komercialnim imenom PU-PRESTARTER (popolno krmilo za sesne pujske), ki ni vsebovalo antibiotikov, je bilo pripravljeno v mešalnici Emona Krmila d.d., Ljubljana (Preglednica 4). Probiotiki so bili pripravljene v laboratoriju Katedre za mlekarstvo na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete.

Preglednica 4: Sestava popolne krmne mešanice za sesne pujske PU-PRESTARTER

Hranilna vrednost krminla			
Sur. belj. (SB), min	23 %		
Sur. vl. (SB), max	4 %		
Sur. mašč. (SM), min	5 %		
Vlaga, max	12 %		
Pepel, max	8 %		
Dodatki na kg krmila			
vit. A	25.000 IE	holinklorid	250 mg
vit. D3	1.600 IE	vit. C	150 mg
vit. E	30 mg	železo	100 mg
vit. K3	10 mg	baker	80 mg
vit. B1	3 mg	mangan	40 mg
vit. B2	6 mg	cink	100 mg
niacin	40 mg	kobalt	1 mg
kalc. pentotamat	20 mg	jod	2 mg
vit. B6	6 mg	selen	0,15 mg
vit. B12	30 mcg	Anti oksidant Sanox	125 mg
folna kislina	2 mg		

3.1.1 Transport živali in vhlevitev

Pujske smo s kombiniranim vozilom pripeljali s farme Pristava. Transportirali smo jih v škatlah iz lepenke, ki so bile napolnjene z ječmenovo slamo, ki je služila kot izolator in preprečevala drsenje. Pujske smo nato naključno vhlevili v 6 kletk po 4 živali in jim takoj ponudili svežo vodo in krmo po volji.



Slika 2: Poskusne kletke s pujski

3.1.2 Aplikacija probiotičnih pripravkov in rokovanje s pujski

Prvi skupini živali (skupina LF) smo dnevno dodajali en odmerek živih celic *Lactobacillus gasseri* LF221(Rif^r) v količini 5×10^{10} ke, drugi skupini (skupina K7) pa smo dnevno dodajali en odmerek živih celic *Lactobacillus gasseri* K7(Rif^r) v količini 5×10^{10} ke. Pujskom v tretji, kontrolni skupini, nismo dodajali probiotikov. Testne probiotike smo dodajali 14 dni. Aplikacija dnevnega odmerka laktobacilov (5 ml) v obliki suspenzije je potekala s pipeto, direktno v gobec. Pri tem smo poskrbeli za to, da je vsaka žival pogoltnila ves odmerek.

3.1.3 Odvzem vzorcev črevesja za histološko in mikrobiološko analizo ČS

Po zakolu živali, izločenih glede na prirast (največji ali najmanjši), smo v šolski klavnici Oddelka za zootehniko odvzeli vzorec (cca 15 cm) posameznega dela tankega črevesa (dvanajstnik, tešče in vito črevo) od vsakega izločenega pujska. Petrijevke z vzorci smo na ledu prenesli v laboratorij Katedre za mlekarstvo, kjer smo vzorce črevesja razprli in sprali s fosfatnim pufrum (PBS, pH=7.2), da smo odstranili vse vidne delce vsebine. Ob spiranju smo pazili, da ne bi poškodovali same sluznice.

3.1.4 Priprava vzorcev črevesja za morfometrične meritve ČS

Od vsakega spranega vzorca smo odrezali 2 cm^2 tkiva in ga prenesli v posodo z nevtralnimi 5 % formaldehidom v fosfatnem pufru. Ko smo zbrali vse vzorce, smo jih nadalje preparirali na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo, Veterinarske fakultete v Ljubljani. Vzorce smo zalili v parafin po standardnem postopku, nato smo z mikrotomom (Leica SM2000R) pripravili $5 \mu\text{m}$ stopničaste histološke rezine v razmiku $50 \mu\text{m}$ ter jih prenesli v vodno kopel (Leica HI 1210), ogreto na 44°C . Ko so gubice na rezinah izginile, smo rezine pobrali iz kopeli na objektna stekelca in jih prenesli v sušilnik (dehidracija vzorcev). Sledilo je barvanje suhih vzorcev, fiksiranih na objektnih stekelcih, s hematoksilinom in eozinom (HE) (po Mayerju).

Barvanje s hematoksilinom (po Mayerju)

PROTOKOL

Predmetna stekla s histološkimi rezinami smo vstavili v košarico za predmetna stekla.

Sledilo je:

DEPARAFINIZACIJA

Ksilol 2 x 5 min

REHIDRACIJA PREKO PADAJOČE ALKOHOLNE VRSTE

100 % etanol 2 x 5 min

96 % etanol 1 x 5 min

70 % etanol 1 x 5 min

Destil. voda 2 x 5 min

BARVANJE

Hematoksilin: 5 – 10 min

Razvijanje v tekoči vodi 10 – 20 min

Eozin B: 0,5 – 2 min

Destilirana voda: 5 min

DEHIDRACIJA

70 % etanol: 1 x 5 min

96 % etanol: 2 x 5 min

100 % etanol: 2 x 5 min

100 % etanol + ksilol (razmerje 1:1): 1 x 5 min

BISTRENJE REZINE

Ksilol: 3 x 5 min

Predmetna stekla s histološkimi rezinami smo nato postopoma jemali iz posode s ksilolom, jih previdno obrisali okoli rezine, delno osušili, nakapljali na rezine smolo za pokrivanje in pokrili s krovnim stekelcem, ki je po velikosti ustrezalo velikosti tkivne rezine.

Ko se je smola posušila, so bili histološki preparati pripravljeni za mikroskopiranje in meritve.

3.1.5 Morfometrična analiza resic tankega črevesa

Za morfometrično analizo smo uporabili tkivne rezine, obarvane s HE. Analize smo izvajali na slikah, posredovanih z mikroskopom in kamero na računalniški ekran (mikroskop Nikon Mikrophot FXA opremljen s CCD kamero, Nikon instruments Europe B. V., Badhoevedorp, Nizozemska). Z računalniškim programom Lucia G (Laboratory Imaging Ltd., Praga, Češka) smo izmerili višino črevesnih resic pri 40-kratni povečavi, za kar smo uporabili 3-4 stopničaste rezine odvzete v razmiku 50 µm. Kvantitativne rezultate za posamezne testne skupine smo nato statistično analizirali.

3.1.6 Mikrobiološka analiza mukoze

Dele črevesja za mikrobiološke analize smo trikrat sprali v 0,15 M fosfatnem pufru (PBS, pH=7,2) ob zmernem mešanju. Koščke črevesa s površino 10 cm² smo homogenizirali v tolikšni količini ¼ Ringerjeve raztopine (Merck, Darmstadt, Nemčija), da smo dobili 100 ml suspenzije. Naslednje razredčitve smo naredili v peptonski vodi z metodo po Kochu, v sterilnih pogojih. Ustrezne desetkratne razredčitve smo nato nacepili na plošče z gojišči, primernimi za ugotavljanje števila (ke/ml oziroma ke/cm² sluznice) posameznih skupin bakterij: VRB (Merck, Darmstadt, Nemčija) za koliformne, MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija) za laktobacile, MRS z dodatkom rifampicina (125 µg/ml) (Merck, Darmstadt, Nemčija) pa za testna seva *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) in LF221 (Rif^r). Hranljivo gojišče VRB smo inkubirali 24 ur pri 30 °C. Inkubacija hranljivega gojišča MRS z ali brez dodanega rifampicina je potekala 72 ur pri 37 °C v anaerobnih pogojih, ki smo jih zagotovili z uporabo Generbox sistema (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Francija).

Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Število kolonijskih enot (ke) bakterij v gramu ali mililitru vzorca smo izračunali po naslednji formuli (IDF standard, 100B, 1991, 3):

$$KE = \Sigma n / ((f_a + f_b) \cdot d)$$

Legenda:

Σn	vsota kolonij, zraslih na ploščah
f_a	število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi
f_b	število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi
d	recipročni razredčitveni faktor prve razredčitve

3.1.7 Statistične metode

Podatke, pridobljene z morfometričnimi meritvami črevesnih resic in tehtanjem pujskov, smo vnesli v računalnik in s programom Excel v okolju Windows pripravili za nadaljnjo statistično obdelavo. Rezultate mikrobioloških analiz smo pretvorili v logaritemske vrednosti ($\log_{10}$) ter jih statistično obdelali s programom Excel v okolju Windows.

Za ugotavljanje razlik med skupinami (K7, LF in kontrola) za maso in prirast smo uporabili model 1, v katerega smo vključili sistemski vpliv skupine. Statistično obdelavo teh podatkov smo opravili s statističnim paketom SAS (2000) z metodo najmanjših kvadratov v proceduri splošnih linearnih modelov (GLM).

MODEL 1

$$y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij}$$

Legenda:

y_{ij}	opazovana vrednost
μ	srednja vrednost
S_i	skupina ($i = 1, 2, 3$)
e_{ij}	ostanek

Vpliv probiotikov LF221 in K7 na višino črevesnih resic, razlike med pujski znotraj posamezne skupine in razlike v višinah črevesnih resic med pujski, žrtvovanimi 5. dan in 20. dan, smo analizirali s statističnim paketom SPSS (verzija 12), s katerim smo opravili testa F in t ter analizo variance za majhne neodvisne vzorce. Z Levinovim testom enakosti varianc smo testirali enakost varianc med posameznimi skupinami oziroma posameznimi pujski znotraj posamezne skupine. Če je bilo tveganje večje od 0,05, smo hipotezo zavrnilo in opravili t-test ob predpostavki za neenake variance in pri tveganju večjem od 0,05.

Ker smo iz vsake skupine ob istem času lahko žrtvovali le po dve živali, pri čemer smo izbrali po dve s skrajnima telesnima masama (največja in najmanjša), primerjava povprečij med skupinami, izračunanih iz vrednosti le dveh živali, ni najbolj smiselna. Iz tega razloga smo podrobneje obravnavali podatke za vsako žival posebej in primerjali posamezne živali med skupinami in znotraj skupin.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV DODANIH PROBIOTIKOV NA RAZVOJ TELESNE MASE IN PRIRAST PUJSKOV

Pujske smo tehtali štirikrat. V preglednici 5 so navedeni rezultati posameznih tehtanj. Po drugem tehtanju sta bila po dva pujska iz vsake skupine žrtvovana, zato so pri prvem in drugem tehtanju podatki za osem, po 3. in 4. tehtanju pa za šest živali iz vsake skupine. Po četrtem tehtanju sta bili žrtvovani še dve živali iz vsake skupine.

Preglednica 5: Telesna masa posameznega pujska na dan tehtanja

Skupina	Ušesna številka prašiča	1.tehtanje (kg)	2.tehtanje (kg)	3.tehtanje (kg)	4.tehtanje (kg)	Skupen prirast teže (kg)
		Dan 0	Dan 5	Dan 13	Dan 19	
K7	19	7,00	7,00	8,90	11,8	4,80
	1	7,00	8,05	*	*	*
	10	8,00	8,60	12,20	16,80	8,80
	2	7,50	7,80	9,80	13,60	6,10
	8	7,00	6,40	*	*	*
	21	7,00	7,40	10,20	13,00	6,00
	23	8,00	9,10	11,80	14,70	6,70
	24	7,00	7,80	11,00	13,90	6,90
LF	11	7,50	8,90	*	*	*
	12	7,50	8,30	11,20	14,15	6,65
	20	7,00	7,00	10,70	14,45	7,45
	27	6,70	7,70	10,80	13,60	6,90
	3	7,00	6,90	*	*	*
	4	8,00	8,45	12,20	15,70	7,70
	6	7,00	7,05	10,60	14,10	7,10
	16	7,00	7,10	10,00	13,10	6,10
Kontrolna skupina	13	7,00	6,75	8,30	11,00	4,00
	25	8,00	9,20	*	*	*
	26	7,00	7,40	11,30	14,95	7,95
	18	7,00	8,15	12,00	15,70	8,70
	5	7,50	8,10	11,50	14,60	7,10
	9	6,70	6,20	*	*	*
	17	7,50	7,50	11,05	14,00	6,50

Opomba:

* - žrtvovan

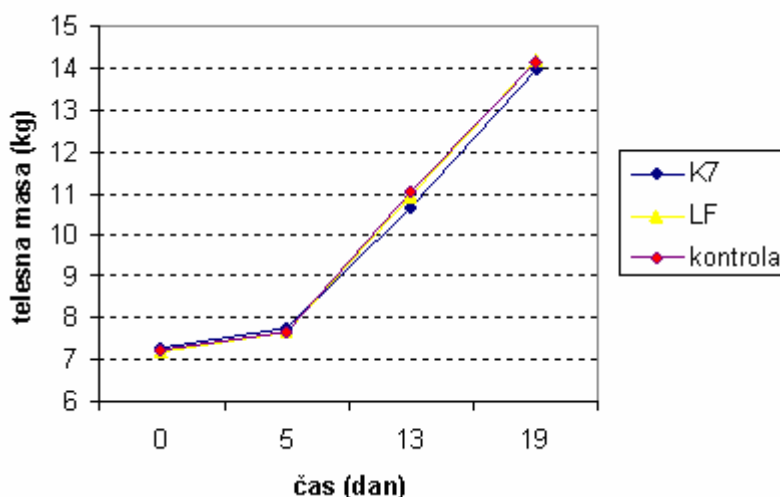
Pri nobenem tehtanju ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami v povprečnih vrednostih telesne mase (Preglednica 6, Slika 6). V obdobju od vhlevitve do 5. dne poskusa, ko smo pujske drugič stehali, je shujšala po ena žival iz skupin K7 in LF221, v kontrolni skupini pa dve živali. Hujšanje oziroma podpovprečen prirast je lahko posledica poodstavitvenega stresa, ki se pogosto kaže tudi v obliki zmanjšane ješčnosti in v pojavu

prebavnih motenj. Pojava driske pri poskusnih živalih nismo opazili. Ker sta bili krma in voda pujskom stalno na razpolago, lahko izključimo možnost, da bi težji (dominantnejši) pujski preprečevali dostop do krme lažjim pujskom. Pri vsem pa ne gre zanemariti dejstva, da je v začetku poskusa dajanje probiotičnih pripravkov predstavljalo za prašiče določen stres. Nekateri so urinirali ali blatili že medtem, ko smo jim dajali dnevno dozo pripravka, drugi pa takoj, ko smo jih vrnili v kletko. Sicer pa je znano, da lahko pujski hujšajo do 14 dni po odstavitvi, pri tem pa se njihova telesna masa lahko zmanjša tudi do 1/3 ali celo več.

Preglednica 6: Povprečna masa pujskov ($\pm$ s.d.) dveh testnih skupin in ene kontrolne med trajanjem poskusa

Čas (dnevi)	Skupina		
	Kontrolna	K7	LF
	Telesna masa (kg) $\pm$ s.d.		
0	7,230 $\pm$ 0,391	7,310 $\pm$ 0,458	7,210 $\pm$ 0,418
5	7,650 $\pm$ 0,880	7,760 $\pm$ 0,857	7,670 $\pm$ 0,781
13	11,030 $\pm$ 1,235	10,650 $\pm$ 1,251	10,910 $\pm$ 0,738
19	14,150 $\pm$ 1,591	13,960 $\pm$ 1,693	14,180 $\pm$ 0,882

V vsaki skupini je bilo 8 živali. Na dan 0 smo pujske namestili v kletke. Naslednji dan (1. dan) smo živalim v testnih skupinah začeli aplicirati probiotične bakterije.



Prikazane vrednosti so povprečje izmerjene telesne mase osmih oziroma šestih (3. in 4. tehtanje) živali iz vsake skupine.

Slika 3: Razvoj telesne mase pujskov, razdeljenih v tri skupine

Povečevanje telesne mase pujskov je prikazano na sliki 6. Ob času prvega tehtanja so bile skupine zelo izenačene. Pri drugem tehtanju je povprečna masa nekoliko odstopala navzgor za skupino K7, pri tretjem in četrtem tehtanju pa je prednjačila kontrolna skupina, vendar razlike niso bile statistično značilne.

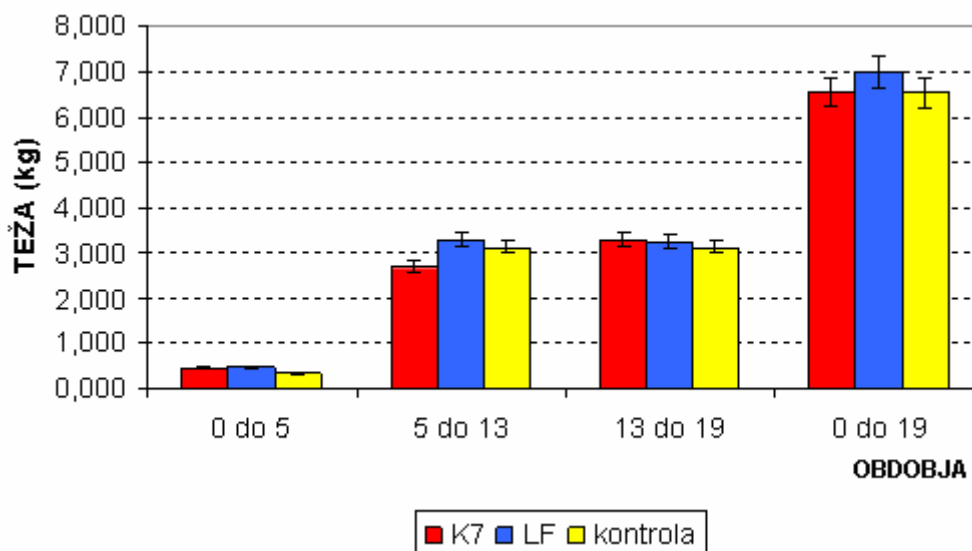
Preglednica 7: Prirast posameznega pujska po obdobju

SKUPINA	OBDOBJE (dnevi)	0 do 5	5 do 13	13 do 19
	Ušesna številka	Telesna masa (Kg)		
K7	19	0,00	1,90	2,90
	1	1,05	*	*
	10	0,60	3,60	4,60
	2	0,30	2,00	3,80
	8	-0,60	*	*
	21	0,40	2,80	2,80
	23	1,10	2,70	2,90
	24	0,80	3,20	2,90
LF	11	1,40	*	*
	12	0,80	2,90	2,95
	20	0,00	3,70	3,75
	27	1,00	3,10	2,80
	3	-0,10	*	*
	4	0,45	3,75	3,50
	6	0,05	3,55	3,50
	16	0,10	2,90	3,10
Kontrola	13	-0,25	1,55	2,70
	25	1,20	*	*
	26	0,40	3,90	3,65
	18	1,15	3,85	3,70
	5	0,60	3,40	3,10
	9	-0,50	*	*
	17	0,00	3,55	2,95
	22	0,50	2,65	2,45

Opombe:

LF, K7 - oznaki za skupini živali, ki so prejemale testni sev LF221 ali K7

* - ni podatka, ker je bila žival žrtvovana



Probiotična seva LF221 in K7 smo živalim v testnih skupinah (K7 in LF) začeli aplicirati na dan 1, zadnji odmerek pa so prejeli na dan 14.

Slika 4: Povprečni prirast pujskov v posamezni skupini v različnih obdobjih

Preglednica 8: Povprečni prirast pujskov v posamezni skupini v različnih obdobjih

OBDOBJE (dnevi)	0 do 5	5 do 13	13 do 19	0 do 19
SKUPINA	Teža (kg)			
K7	0,456	2,700	3,317	6,550
	± 0,568	± 0,663	± 0,506	± 3,191
LF	0,463	3,317	3,267	6,983
	± 0,550	± 0,396	± 0,401	± 3,266
Kontrola	0,344	3,129	3,125	6,536
	± 0,615	± 0,904	± 0,520	± 3,042

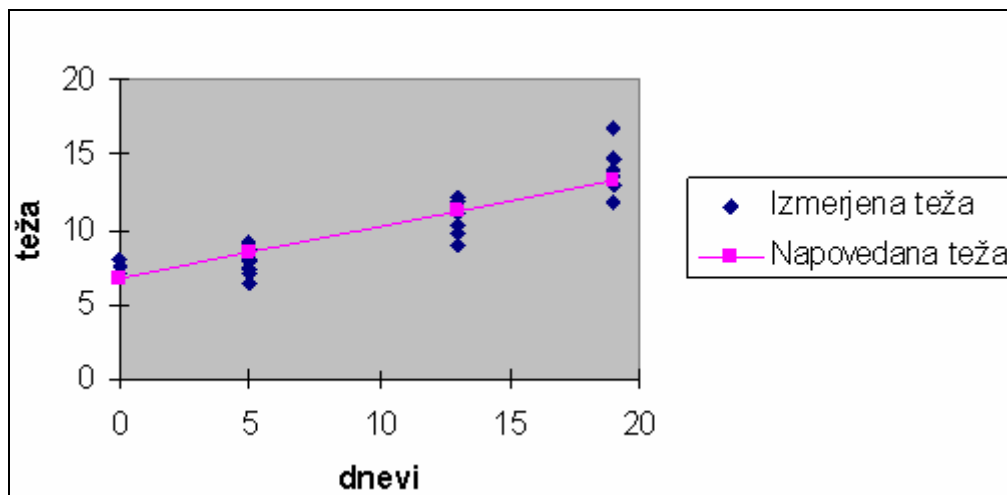
Pridobivanje telesne mase pujskov v posamezni skupini smo izračunali za tri obdobja trajanja poskusa ter za celotno obdobje. Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik ($p > 0,05$) med skupinami v priraščanju. V prvem obdobju (Preglednica 7) je najbolj pridobil na teži pujsek z ušesno številko 11 iz skupine K7, v drugem in tretjem obdobju pa pujsek 10 iz skupine LF, ki je prejemal probiotik LF221. Opazili smo tudi, da so posamezni pujski le v prvem obdobju izgubili težo, kar se je odrazilo na ustrezno nižjem povprečnem prirastu. V skupini K7 je hujšal pujsek št. 8, v LF pujsek št. 3, v kontrolni skupini pa pujska št. 13 in 9. Omenjeni pujski, razen št. 9 (izhodiščna masa 6,70 kg), so imeli izhodiščno (vhlevitveno) maso 7,00 kg. Tu so bili tudi pujski, ki pa so ob drugem tehtanju (5. dan) imeli enako telesno maso kot ob vhlevitvi: v skupini K7 pujsek št. 19, v LF pujsek št. 20, v kontrolni skupini pa pujsek št. 17.

Skupina K7 je najbolj priraščala le v obdobju med 13. in 19. dnevom, v celem obdobju (0-19) pa je bil skupni prirast najboljši v skupini LF. Sledila ji je skupina K7, vendar je razlika med skupnima prirastoma za celotno obdobje (0-19) med skupinama K7 in kontrolo

minimalna (14 g). Kontrolna skupina je imela povprečni prirast večji kot skupina K7 le v obdobju od 5. do 13. dne. V času apliciranja probiotikov (do 14. dne) in v celotnem obdobju (0-19. dan) je bil prirast v povprečju najboljši v skupini LF. Predvidevamo, da bi bil ob večjem številu testnih živali učinek tudi statistično značilen.

4.1.1 Regresijska analiza telesne mase pujskov v odvisnosti od časa

4.1.1.1 Linearna odvisnost med maso pujskov in časom krmljenja skupine K7

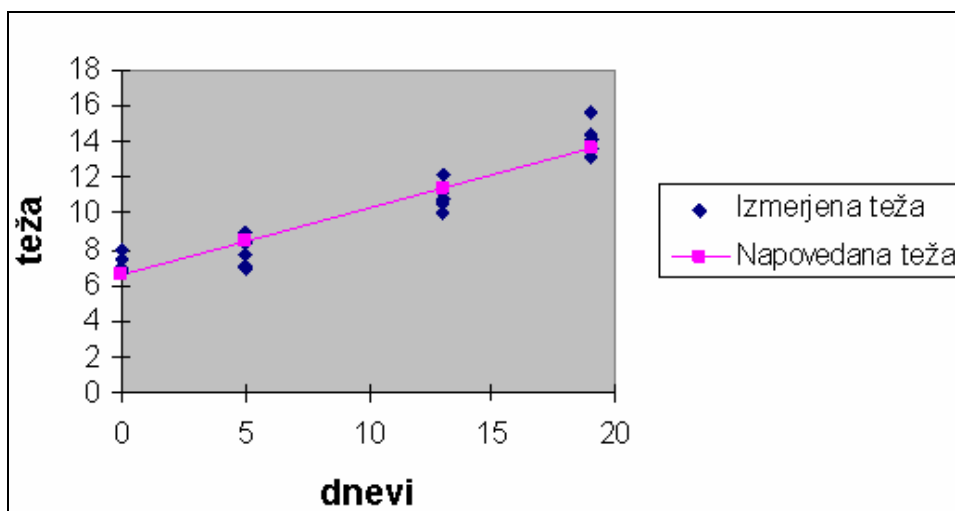


Slika 5: Napoved teže za skupino K7

Naraščanje telesne mase s časom lahko opiše premica $y = 6,66 + 0,35 * t$, kjer je t čas v dnevih od 16.4.2002 naprej. Oba koeficienta sta statistično značilno različna od 0 zaradi visokih vrednosti t-testa in pripadajoče majhne verjetnosti tveganja. Celotna regresija je statistično značilna, saj je vrednost F-testa enaka 107,82 pri tveganju, manjšem od 0,0005. S številom dni lahko pojasnimo 80% variabilnosti teže (Adjusted R Square=0,804). Preostalih 20% pa predstavlja vpliv neznanih dejavnikov.

B= 0,35 nam pove, da se je masa pujskov skupine K7 v povprečju povečala za 0,35 kg.

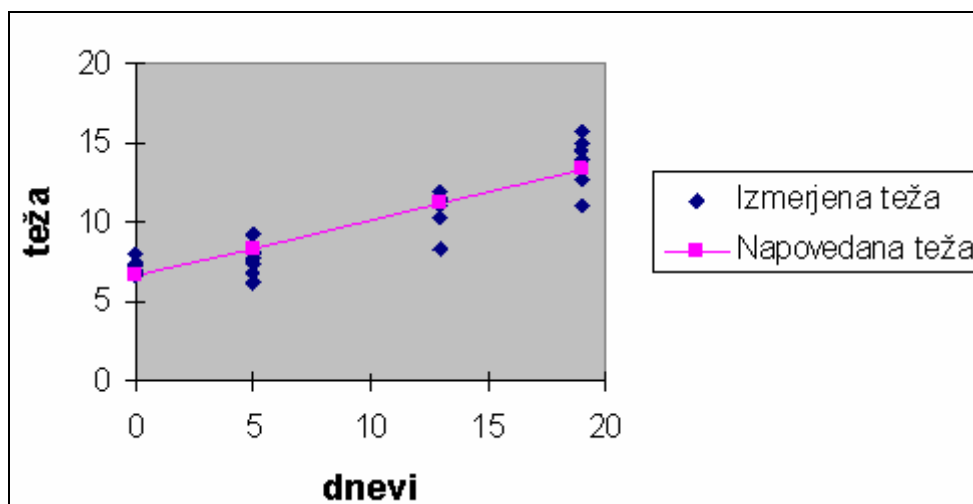
4.1.1.2 Linearna odvisnost med maso pujskov in časom krmljenja skupine LF



Slika 6: Napoved teže za skupino LF

Naraščanje telesne mase s časom opiše premica $y = 6,56 + 0,37 * t$, kjer je t čas v dnevih od 16.04.2002 naprej. Korelacija pri korelacijskem koeficientu $r = 0,898$ je statistično značilna pri stopnji tveganja $p < 0,1$ po T-testu. $B = 0,37$ nam pove, da se je masa pujskov skupine LF vsak dan v povprečju povečala za 0,37 kg.

4.1.1.3 Linearna odvisnost med maso pujskov in časom krmljenja za kontrolne skupine



Slika 7: Napoved teže za kontrolno skupino

Naraščanje telesne mase s časom opiše premica $y = 6,56 + 0,35 * t$, kjer je t čas v dnevih od 16.04.2002 naprej. Korelacija pri korelacijskem koeficientu $r = 0,898$ je statistično značilna pri stopnji tveganja $p < 0,1$ po T-testu. $B = 0,35$ nam pove, da se je masa pujskov kontrolne skupine vsak dan v povprečju povečala za 0,35 kg.

4.2 REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE ČREVESNE SLUZNICE

Preglednica 9: Število kolonijskih enot kaliformnih bakerij, laktobacilov in testnih probiotičnih sevov L gasseri, K7 in LF221 v črevesni sluznici različni delov črevesa, vsebini vitega črevesa in blatu pojskov žrtvovanih 5. ali 20 dan

SKUPINA	Dan odvzema vzorca	log ke/10 cm ² črevesne sluznice koliformni/laktobacili/ K7 ali LF221			log ke/g vsebine vitega črevesa	logke/g blata
		Dvanajstnik	Tešče črevo	Vito črevo		
K7	5	-/4,73/ -	-/3,64/ -	4,77/6,13/3,20	6,90/8,71/5,18	6,21/8,49/4,73
	5	2,93/4,08/2,14	3,79/4,68/2,23	4,90/4,34/ -	6,98/7,64/ -	6,46/6,26/4,36
	20	-/2,78/ -	-/ -/ -	4,38/4,98/ -	6,55/6,88/3,59	5,64/ 7,04/ -
	20	-/4,54/ -	2,91/4,41/ -	4,48/4,54/ -	6,81/7,81/ -	6,78/ 7,73/ -
LF	5	-/4,01/ -	-/3,20/ -	3,85/4,04/2,91	6,38/7,79/ -	6,29/8,85/6,85
	5	4,26/5,14/ -	2,56/3,54/ -	4,23/5,25/ -	6,20/7,90/ -	5,62/8,58/4,62
	20	2,41/4,68/ -	3,51/5,29/ -	4,45/4,84/ -	6,25/7,40/2,90	6,00/ 7,20/ -
	20	-/4,18/ -	-/3,85/ -	3,53/4,28/ -	6,08/7,36/ -	3,95/8,04/4,08
Kontrola	5	3,40/5,35/ -	3,49/4,14/ -	5,65/5,84/ -	*	5,90/ 8,96/ -
	5	3,41/2,96/ -	-/ -/ -	4,20/4,92/ -	*	6,51/ 7,59/ -
	20	2,78/4,87/ -	3,49/4,14/ -	5,65/5,84/ -	7,29/7,65/ -	7,89/ 7,26/ -
	20	2,69/5,36/ -	2,43/4,67/ -	4,10/4,81/ -	7,34/8,47/ -	6,59/ 7,60/ -

- : število kolonijskih enot pod mejo detekcije 100 ke/10 cm²

*: ni vzorca

Ke: kolonijske enote

Žive celice seva K7 smo ugotovili na črevesni sluznici dvanajstnika in teščega črevesa ene od dveh živali, žrtvovanih 5. dan. Na 10 cm² črevesne sluznice dvanajstnika in teščega črevesa smo prešteli 138 oziroma 170 ke, kar predstavlja 1,1 % oziroma 0,4 % vseh laktobacilov. V vitem črevesu in vsebini vitega črevesa iste živali je bilo število kolonijskih enot seva K7 pod mejo detekcije. V blatu iste živali je bilo $2,3 \times 10^4$ ke/g (to je 4,36 log ke/g) seva K7, kar predstavlja 1,3 % celotne populacije laktobacilov v blatu. Pri drugi, istočasno žrtvovani živali iz skupine K7, smo žive celice K7 ugotovili na črevesni sluznici vitega črevesa, v vsebini vitega črevesa in v blatu, ne pa tudi v črevesni sluznici dvanajstnika in teščega črevesa.

Pri dveh živalih iz skupine K7, žrtvovanih 20. dne, kar je 6 dni po prenehanju dodajanja seva K7, je bilo živih celic K7 nad mejo detekcije le v vsebini vitega črevesa enega pujska, vendar manj kot 0,1 % vseh laktobacilov.

Pri živalih iz skupine LF221 smo žive celice seva LF221 ugotovili v blatu obeh živali, žrtvovanih 5. dan, pri čemer je bilo število ke/g pri eni živali okrog 1 % vseh laktobacilov, pri drugi pa manj kot 0,1 %. Ta sev smo ugotovili tudi v sluznici vitega črevesa prve živali,

in sicer 7,4 % od skupnega števila laktobacilov. Pri živalih, ki so bile žrtvovane 20. dan, v črevesni sluznici nismo več ugotovili živih celic LF221, v manjšem številu (manj kot 0,1 % vseh laktobacilov) pa so bile prisotne v vsebini vitega črevesa oziroma v blatu. Število kolonijskih enot koliformnih bakterij se je zelo razlikovalo tudi med živalmi iz iste skupine, tako da morebitnega neposrednega vpliva aplikacije sevov K7 ali LF221 na število koliformnih bakterij nismo ugotovili.

4.3 UGOTAVLJANJE VIŠIN ČREVESNIH RESIC

Meritve črevesnih resic smo opravili na vzorcih različnih delov črevesa pri 12-ih žrtvovanih živalih, od katerih jih je bilo 6 žrtvovanih po 5-ih, ostalih 6 pa po 20-ih dneh poskusa. Želeli smo proučiti vpliv probiotikov oziroma ali obstaja povezava med telesno maso in višino črevesnih resic.

Na vzorcih različnih delov črevesa (dvanajstnik, tešče črevo, vito črevo) smo za vsako žival opravili meritve višin vseh nepoškodovanih črevesnih resic. Rezultate meritev višin črevesnih resic za posamezen del črevesja smo prikazali kot povprečne vrednosti vseh meritev za posameznega pujska, s pripadajočim standardnim odklonom (Preglednica 9) po posameznih skupinah. V dveh merjenjih, to je 5. in 20. dan, smo iz vsake skupine izbrali za žrtvovanje po dva pujska z izstopajočo telesno maso (najtežjega in najlažjega pujska iz vsake skupine) glede na ostale.

Preglednica 10: Rezultati meritev višin ČR na vzorcih dvanajstnika, vitega črevesa in teščega črevesa

Skupina	Dan	Ušesna številka	Višina resic v μm			
				Dvanajstnik	Tešče črevo	Vito črevo
Kontrola	5	25	Povpr.	417,230	371,250	290,510
			SD	$\pm 57,87$	$\pm 71,08$	$\pm 55,213$
		9	Povpr.	406,208	252,787	235,354
			SD	$\pm 100,389$	$\pm 78,650$	$\pm 57,901$
	20	18	Povpr.	513,920	385,954	304,921
			SD	$\pm 139,029$	$\pm 44,339$	$\pm 78,714$
		13	Povpr.	487,614	377,780	359,740
			SD	$\pm 113,238$	$\pm 59,244$	$\pm 23,83$
K7	5	1	Povpr.	511,031	393,120	192,680
			SD	$\pm 65,936$	$\pm 41,802$	$\pm 40,982$
		8	Povpr.	256,135	221,404	172,758
			SD	$\pm 54,956$	$\pm 50,018$	$\pm 43,302$
	20	10	Povpr.	448,650	401,680	304,846
			SD	$\pm 35,48$	$\pm 72,22$	$\pm 47,758$
		21	Povpr.	476,797	prizadet epitelij	248,477
			SD	$\pm 77,233$		$\pm 50,92$
LF	5	11	Povpr.	363,855	277,769	276,985
			SD	$\pm 87,542$	$\pm 84,519$	$\pm 52,834$
		3	Povpr.	367,485	332,556	322,987
			SD	$\pm 86,641$	$\pm 47,349$	$\pm 88,177$
	20	4	Povpr.	409,785	342,015	281,687
			SD	$\pm 67,267$	$\pm 45,954$	$\pm 37,009$
		27	Povpr.	550,451	*	*
			SD	$\pm 107,957$	*	*

4.3.1 Vpliv skupine na višino ČR v posameznem delu črevesja

O vplivu dodajanja probiotikov na višino črevesnih resic smo sklepali na podlagi statistične analize meritev višin črevesnih resic treh skupin pujskov: prve skupine, ki je prejela sev *Lb. gasseri* K7, druge skupine, ki je prejela sev *Lb. gasseri* LF221, in tretje skupine pujskov, ki ni prejela probiotičnega dodatka.

Preglednica 11: Rezultati T testa pri analizi dolžine ČR med dvema pujkoma posamezne skupine na vzorcih dvanajstnika, vitega črevesa in teščega črevesa

Skupina	Dan	Ušesna številka	Vrednosti T testa in stopnje tveganja			
				Dvanajstk	Tešče črevo	Vito črevo
Kontrola	5	25	t	t = 0,45	t = 4,5	t = 3,8
		9	p	p = 0,65	p < 0,01	p < 0,01
	20	18	t	t = 0,8	t = 0,48	t = 3,3
		13	p	p = 0,43	p = 0,64	p < 0,01
K7	5	1	t	t = 19,2	t = 11,7	t = 1,3
		8	p	p < 0,01	p < 0,01	p = 0,19
	20	10	t	t = -0,15		t = 2,7
		21	p	p = 0,15	*1	p = 0,01
LF	5	11	t	t = -0,16	t = -3,1	t = -2,45
		3	p	p = 0,87	p < 0,01	p = 0,02
	20	4	t	t = -6,06	*2	
		27	p	p < 0,01	*2	*2

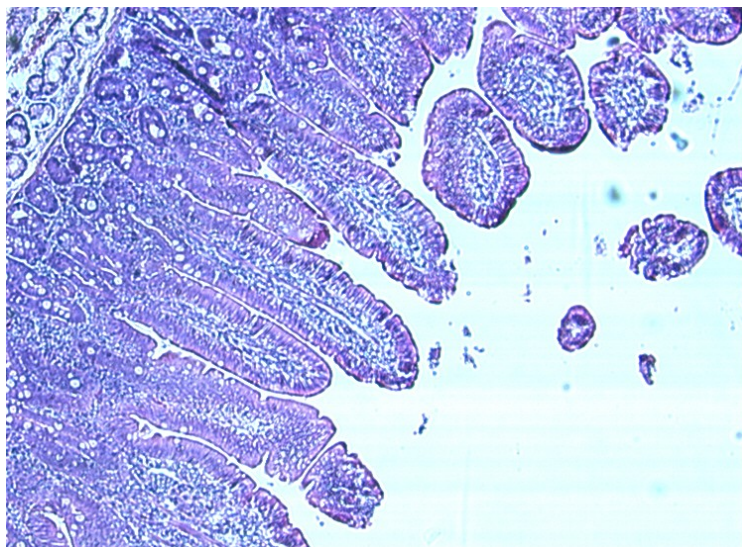
p: stopnja tveganja

t: vrednost t-testa (T-eksponencialen)

*1: prizadet epitelij

*2: nepravilno odvzet vzorec

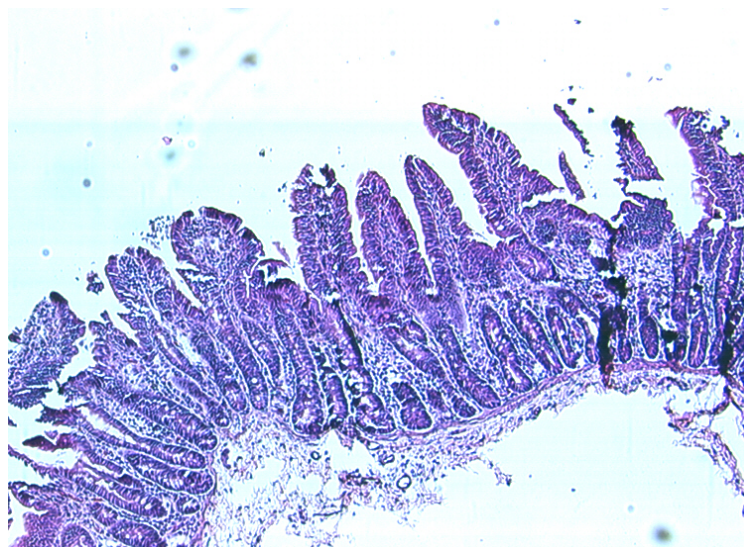
4.3.1.1 Dvanajstnik



Slika 8: Vzdolžni prerez črevesnih resic dvanajstnika

Na področju dvanajstnika so bile statistično značilne razlike v višini črevesnih resic le med pujski kontrolne in LF skupine ($p=0,014$), ki so bili žrtvovani 5. dan poskusa. V tem primeru so bile resice dvanajstnika pujskov iz kontrolne skupine daljše. Razlika je razvidna na sliki 11; rdeče obarvana stolpiča s podatki za kontrolne pujske (ušesna številka 25 in 9) za 5. dan sta opazno višja od rumenih stolpičev, ki predstavljata pujska (ušesna številka 11 in 3), tretirana s probiotikom LF221. Zanimivo je, da sta bila po dva pujska v isti skupini zelo izenačena med seboj v višini resic, čeprav sta se razlikovala po izhodiščni teži. Pri primerjavi višin črevesnih resic v dvanajstniku pri pujskih, ki so prejeli probiotik K7 in kontrolnimi pujski, nismo ugotovili statistično pomembnih razlik. Tu pa je zelo izstopal pujsek št. 1, ki je imel največjo povprečno višino črevesnih resic dvanajstnika med pujski na 5. dan in je dosegel večino povprečnih višin resic pujskov, žrtvovanih 20. dan poskusa. Pri meritvah 20. dne značilne razlike med skupinami ni bilo. Izstopal pa je pujsek št. 27 (skupina LF), ki je imel med vsemi pujski največjo povprečno višino resic dvanajstnika, hkrati pa najmanjši prirast v skupini LF med dvema tehtanji.

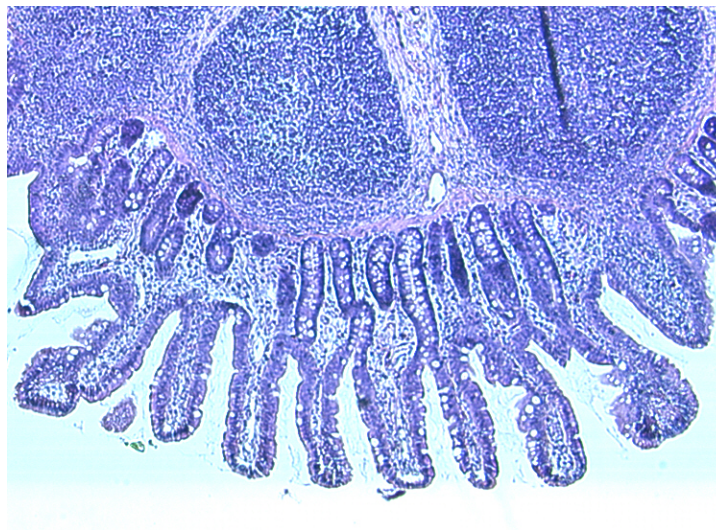
4.3.1.2 Tešče črevo



Slika 9: Vzdolžni prerez črevesnih resic teščega črevesa

V področju teščega črevesa nismo ugotovili statistično značilne razlike v višini črevesnih resic pri pujskih, žrtvovanih 5. dan, kakor tudi ne na 20. dan. Na 5. dan sta bili kontrolna skupina in skupina K7 zelo izenačeni. Na sliki 12 lahko vidimo, da sta imela težja (št. 25, kontrola; št. 1, K7) in tudi lažja pujska (št. 9, kontrola; št. 1, K7) praktično enako dolge resice teščega črevesa. V skupini LF pa sta imela pujska št. 11 in 3 sicer nekoliko daljše resice od lažjih dveh kontrolne (št. 9) in skupine K7 (št. 1), vendar vseeno mnogo krajše od težjih dveh iz omenjenih skupin. Najdaljše resice je imel pujsek št. 1 (K7), najkrajše pa žival št. 8 (K7). Razlika povprečnih meritev višin resic omenjenih pujskov je bila 172 μm . Pri pujskih, žrtvovanih 20. dan, manjkata podatka za pujska št. 21 (K7, lažji pujsek) in št. 27 (LF, lažji pujsek). Med njimi je imel najdaljše resice težji pujsek št. 10 iz skupine K7, sledil mu je težji pujsek št. 18 iz kontrolne skupine in nato še lažji št. 13 iz kontrolne. Najmanjše povprečje vseh meritev resic teščega črevesa je imela žival št. 4 (težji pujsek) iz skupine LF. Razlika med najdaljšimi (št. 10, K7) in najkrajšimi resicami (št. 4, LF) med pujski, žrtvovanimi 20. dan, je bila 41 μm , kar je bistveno manj kot pri meritvah na 5. dan.

4.3.1.3 Vito črevo



Slika 10: Vzdolžni prerez črevesnih resic vitega črevesa

Na področju vitega črevesa so se statistično značilne razlike ($p < 0,05$) pokazale med skupinami tako pri pujskih, ki so bili žrtvovani 5., kakor tudi 20. dan. Najdaljše resice v vitem črevesu sta imela pujska kontrolne skupine na 20. dan. Med pujski, žrtvovanimi 5. dan, pa sta imela najdaljše resice pujska iz skupine LF, najkrajše pa tista iz skupine K7. V vitem črevesu sta imela pujska št. 1 in 8 iz skupine K7 na 5. dan statistično značilno najkrajše resice. Njuni povprečni višini resic vitega črevesa pa sta bili zelo izenačeni, nekoliko daljše resice je imel pri tem pujsek št. 1, ki je imel ob zakolu višjo telesno maso. Sledi kontrolna skupina, kjer je bila razlika v višini resic med pujskoma št. 25 in 9 večja. Tudi tu je imel daljše resice težji pujsek, v tem primeru žival št. 25. V višini resic vitega črevesa je vodila skupina LF. V tej je imel pujsek št. 11 sicer krajše resice kot pujsek št. 25 iz kontrolne skupine, vendar med vsemi pujski (na 5. dan) je imel pujsek št. 3 najdaljše resice. Slednji je imel manjšo telesno maso od pujskov št. 11 in 25 na 5. dan poskusa. 20. dan poskusa je med skupinami najbolj izstopala kontrolna s pujskoma št. 18 in 13. Pujsek št. 13, z najmanjšo telesno maso ob zakolu v skupini, je imel od vseh žrtvovanih pujskov najdaljše resice vitega črevesa. Sledil mu je pujsek št. 18, ki je imel enako dolge resice kot pujsek št. 10 iz skupine K7. V slednji je bil še pujsek št. 21, ki je imel najmanjšo težo v skupini na 20. dan poskusa. V skupini LF so bili pridobljeni podatki samo za znotraj skupine najtežjega pujska št. 4, ki je imel daljše resice le od pujska št. 21 (skupina K7), žrtvovanega prav tako na 20. dan.

4.3.2 Razlike v višini ČR posameznih delov črevesa, med 5. in 20. dnem, znotraj skupine

4.3.2.1 Dvanajstnik

Razlike v višini črevesnih resic dvanajstnika smo ugotovili v vseh treh testnih skupinah, ko smo znotraj skupine primerjali povprečne višine resic pujskov, žrtvovanih 5. in 20. dan. Povprečne višine resic dvanajstnika pujskov na 20. dan so bile v vseh skupinah daljše od le-teh na 5. dan. Največjo razliko v višini resic med 5. in 20. dnem smo zabeležili znotraj kontrolne skupine, sledili sta ji skupini LF in nato K7.

Meritve za posamezna pujska znotraj vsake skupine na 5. oziroma 20. dan so bile večinoma zelo izenačene, izstopala sta pujska št. 1 in 8 (K7; 5. dan), ter pujska št. 4 in 27 (LF; 20. dan), kjer so bile razlike v višini večje. Pujsek št. 1, ki je imel v skupini največji prirast do 5. dne, je imel tudi največjo povprečno višino resic dvanajstnika, pri pujsku št. 8 pa je bila povprečna višina resic dvanajstnika najmanjša, tudi v primerjavi z višinami resic dvanajstnika pujskov iz drugih testnih skupin. V primeru pujskov št. 4 in 27 (LF; 20. dan), je imel daljše resice dvanajstnika pujsek št. 27, ki je imel med 16. in 20. dnem poskusa najmanjši prirast v skupini. Povprečna višina resic dvanajstnika tega pujska je bila večja celo od resic pujskov iz drugih dveh skupin.

4.3.2.2 Tešče črevo

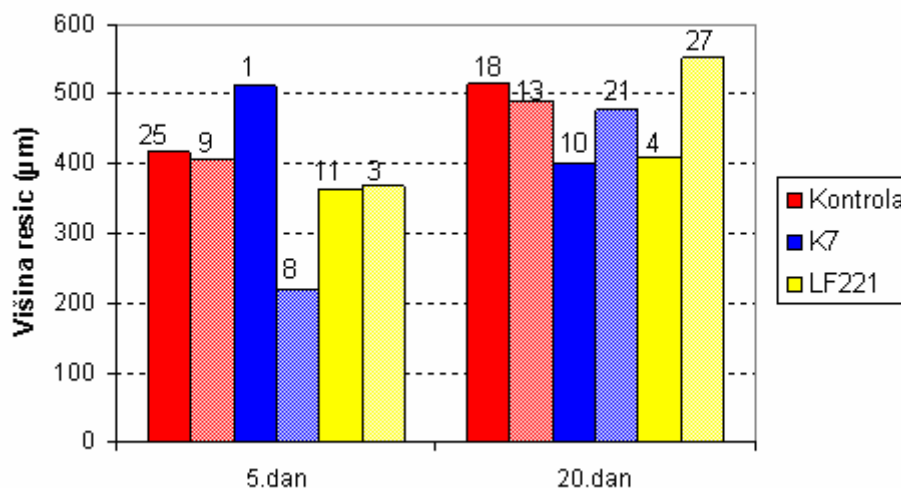
V področju teščega črevesa so bile značilne razlike v kontrolni skupini med 5. in 20. dnem. Povprečna višina resic teščega črevesa pujskov št. 18 in 13, ki sta bila žrtvovana 20. dan, je bila večja od le-te pri pujskih št. 25 in 9, žrtvovanih 5. dan. Povprečni višini resic starejših pujskov sta bili pri tem bolj izenačeni, večje odstopanje je bilo med mlajšima pujskoma (št. 25 in 9). V skupini K7 sta imela pujska št. 1 in 8 (žrtvovana 5. dan) krajše resice teščega črevesa v primerjavi s pujskom št. 10 (žrtvovan 20. dan), vendar je razlika med pujskom št. 1 in 10 minimalna. V skupini LF je razlika med pujskom št. 3 (žrtvovan 5. dan) in št. 4 (žrtvovan 20. dan) prav tako majhna.

4.3.2.3 Vito črevo

Pri vitem črevesu so se pokazale značilne razlike v višini resic med 5. in 20. dnem v kontrolni in skupini K7. V kontrolni skupini sta imela starejša pujska št. 18 in 13 (žrtvovana 20. dan) daljše resice kot mlajša, št. 25 in 9 (žrtvovana 5. dan). Razlika med povprečnima vrednostima višin resic lažjih dveh pujskov (št. 9 na 5. dan in št. 13 na 20. dan) je bila veliko večja kot pri težjih dveh, ki sta bila dokaj izenačena. V skupini K7 sta imela starejša pujska (št. 10 in 21; žrtvovana na 20. dan) tudi daljše resice v primerjavi z mlajšima dvema (št. 1 in 8; žrtvovana 5. dan). V tem primeru je bila razlika med povprečnima višinama večja med težjima pujskoma (št. 1 in 10). V skupini LF nismo pridobili podatkov za pujska št. 27 (najlažji v skupini na 20. dan). Na sliki 13 vidimo, da je bila povprečna višina resic vitega črevesa starejšega pujska št. 4 (najtežji v skupini 20. dan) enaka povprečni višini resic mlajšega pujska št. 11 (najtežji v skupini 5. dan). Pujsek št. 3, ki je bil 5. dan najlažji v skupini, pa je imel daljše resice kot pujsek št. 4 (najtežji v skupini 20. dan).

4.3.3 Razlike v višini ČR celotnega proučevanega črevesja med 5. in 20. dnem, znotraj skupine

V kontrolni in skupini LF so imeli statistično značilno daljše resice pujski, žrtvovani 20. dan poskusa. V skupini K7 ni bilo statistično značilnih razlik v višini resic med pujski, žrtvovanimi 5. dan, in tistimi, ki so bili žrtvovani 20. dan poskusa.

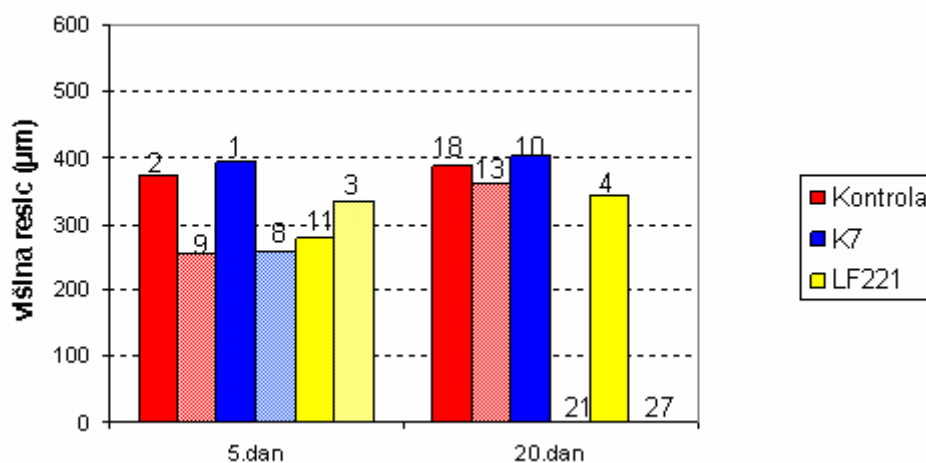


Barve stolpcev označujejo, kateri skupini so živali pripadale: Kontrola - živali poleg krmila niso dobivale dodatkov, K7 - živali so od 1. do 14. dne dobivale bakterijski sev K7, LF - živali so od 1. do 14. dne dobivale bakterijski sev LF221. Številke nad stolpiči pomenijo oznako živali.

Stolpci svetlejšje barve prikazujejo povprečno višino resic za žival, ki je imela v določeni skupini najmanjšo telesno maso, stolpci temnejše barve pa za tisto z največjo telesno maso.

Slika 11: Višine ČR dvanajstnika pri 12-ih živalih, žrtvovanih 5. ali 20. dan poskusa

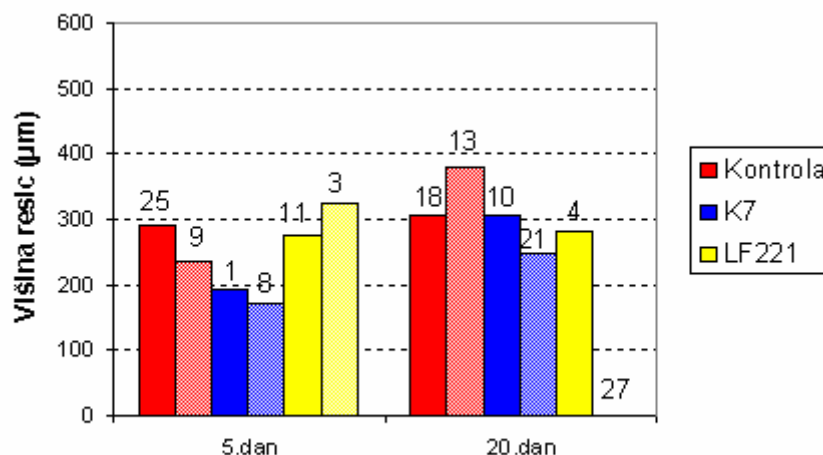
Iz slike 11 vidimo, da so bile črevesne resice dvanajstnika posamezne skupine prašičev, žrtvovanih 5. dan, krajše kot le-te pri pujskih, žrtvovanih 20. dan. V tem primeru izstopa povprečna višina resic dvanajstnika pujska št. 1, ki je presegla večino višin resic pujskov, žrtvovanih 20. dan. Resice dveh pujskov v posamezni skupini so bile dokaj izenačene, izstopala pa sta pujska št. 1 in 8, žrtvovana 5. dan, ter pujska št. 27 in 4, žrtvovana 20. dan, kjer so bile razlike v višini resic dvanajstnika velike in statistično značilne ($p < 0,01$). V prvem primeru (skupina K7) je imel daljše resice težji pujsek (št. 1), v drugem (skupina LF) pa lažji (št. 27).



Barve stolpcev označujejo, kateri skupini so živali pripadale: Kontrola - živali poleg krmila niso dobivale dodatkov, K7 - živali so od 1. do 14. dneva dobivale bakterijski sev K7, LF - živali so od 1. do 14. dne dobivale bakterijski sev LF221. Za živali 21 in 27 nimamo podatka. Stolpci svetlejšje barve prikazujejo povprečno višino resic za žival, ki je imela v določeni skupini najmanjšo telesno maso, stolpci temnejše barve pa za tisto z največjo telesno maso. Številke nad stolpiči pomenijo oznako živali.

Slika 12: Višine ČR teščega črevesa pri 12-ih živalih, žrtvovanih 5. ali 20. dan poskusa

V teščem črevesu smo ugotovili statistično značilne razlike višin črevesnih resic v kontrolni skupini med pujskoma št. 25 in 9 ($p < 0,01$), v skupini K7 med pujskoma št. 1 in 8 ($p < 0,01$) ter v skupini LF med pujskoma št. 11 in 3 ($p < 0,01$). Vse omenjene razlike se nanašajo na živali, ki so bile žrtvovane 5. dan poskusa. Pujska št. 1 in 25, ki sta imela statistično značilno daljše resice, pa sta bila tudi najtežja v posamezni skupini 5. dan poskusa. Pujska št. 8 je imel 5. dan najmanjšo telesno maso v skupini K7.



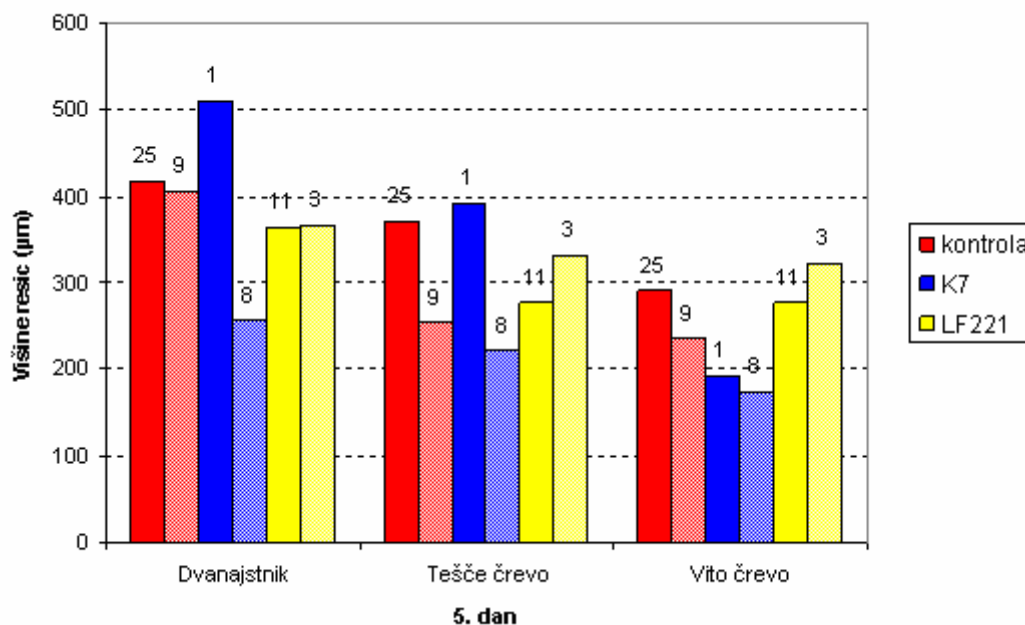
Barve stolpcev označujejo, kateri skupini so živali pripadale: Kontrola - živali poleg krmila niso dobivale dodatkov, K7 - živali so od 1. do 14. dne dobivale bakterijski sev K7, LF - živali so od 1. do 14. dne dobivale bakterijski sev LF221. Stolpci svetlejšje barve prikazujejo povprečno višino resic za žival, ki je imela v določeni skupini najmanjšo telesno maso, stolpci temnejše barve pa za tisto z največjo telesno maso. Številke nad stolpiči pomenijo oznako živali.

Slika 13: Višine ČR vitega črevesa pri 12-ih živalih, žrtvovanih 5. ali 20. dan poskusa

V vitem črevesu imamo statistično značilne razlike višin črevesnih resic v kontrolni skupini med pujskoma št. 25 in 9, žrtvovana 5. dan ($p < 0,001$), in pujskoma št. 13. in 18, žrtvovana 20. dan ($p < 0,01$), v skupini K7 med pujskoma št. 10 in 21, žrtvovana 20. dan ($p = 0,01$), ter v skupini LF med pujskoma št. 11 in 3, žrtvovana 5. dan ($p = 0,02$). Statistično značilne razlike v višini resic med najtežjim in najlažjim pujskom znotraj posamezne skupine na dan zakola niso vedno v prid težjih pujskov, izjema sta pujska št. 3 iz skupine LF (žrtvovan 5. dan), ki je imel daljše resice kot pujske št. 11, in pujske št. 13 (žrtvovan 20. dan), ki je imel daljše resice kot pujske št. 18.

4.4 VIŠINA ČR V POSAMEZNEM DELU ČREVESA, NEODVISNO OD SKUPINE

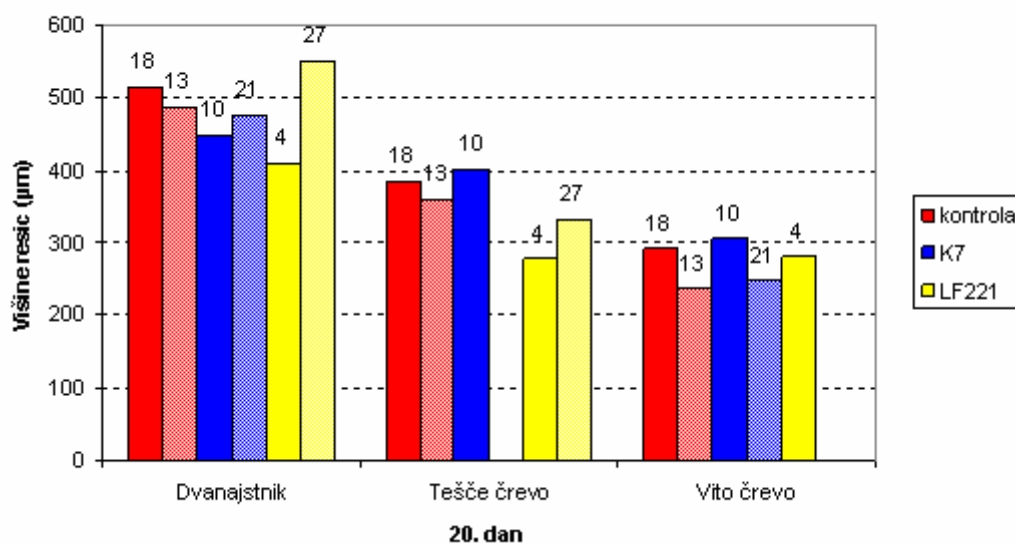
Pri vseh pujskih so bile resice najdaljše v dvanajstniku ter najkrajše v vitim črevesu.



Številke nad stolpci pomenijo oznako živali.

Slika 14: Višine ČR vzdolž tankega črevesa posameznega pujska na 5. dan poskusa

Razlike v dolžini resic vzdolž tankega črevesa niso bile pri vseh živalih enako izrazite. Na sliki 14 je razvidno, da so bile pri pujsku št. 1 v skupini K7 veliko večje razlike v višinah resic med posameznimi deli črevesja kot pri pujsku št. 8. Pri pujsku št. 1 je bila razlika v višini resic med dvanajstnikom in vitim črevesom 318,35 µm, pri pujsku št. 8 pa le 83,38 µm. Najmanjšo razliko v višini resic med dvanajstnikom in vitim črevesom (44,49 µm) smo ugotovili pri pujsku št. 3 iz skupine LF. Pujski se razlikujejo tudi v intervalu med višino resic dvanajstnika in višino resic teščega črevesa. Ta razlika je bila najmanjša pri živali št. 8 (34,7 µm) in največja pri živali št. 9 (153,4 µm). Razlika med višino resic teščega in vitega črevesa je bila pri pujsku št. 9 le 17,43 µm, pri pujsku št. 1 pa 200,4 µm.



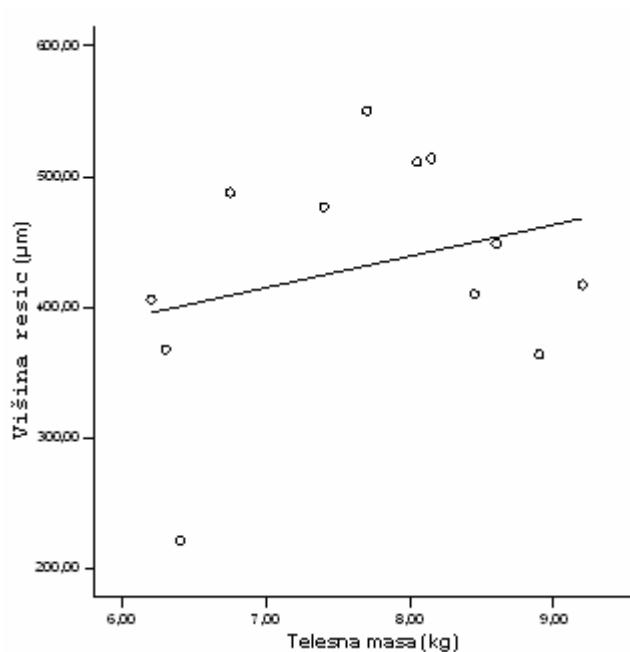
Številke nad stolpci pomenijo oznako živali.

Slika 15: Padanje višin resic vzdolž tankega črevesa na 20. dan poskusa

Pri vseh pujskih, ne glede na to, kdaj so bili žrtvovani, vidimo, da so bile razlike v višini resic med posameznimi deli tankega črevesa zelo različne.

4.5 POVEZAVA MED VIŠINO RESIC IN TELESNO MASO

4.5.1 Dvanajstnik



Slika 16: Povezava med telesno maso in višino resic dvanajstnika

$$R^2=0,082 \text{ (} r = 0,286 \text{)}$$

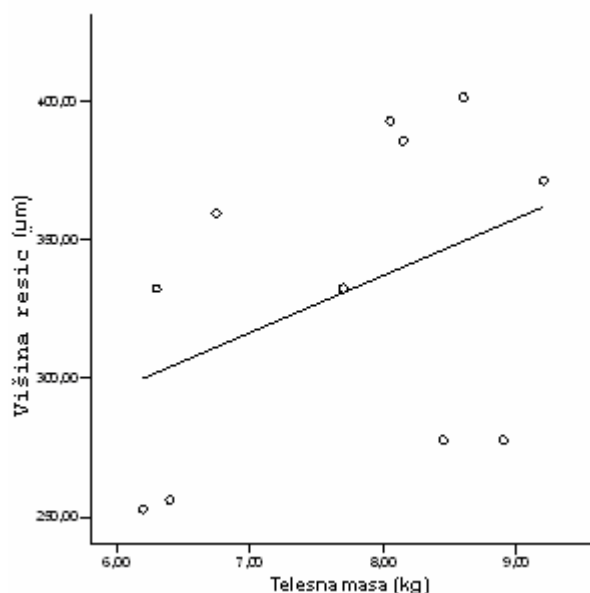
Vpliv telesne mase na višino resic lahko pojasnimo v 8,2 % z linearno funkcijo:

$$\text{Višina resic} = 246,587 + 24,05 * \text{telesna masa}$$

Korelacija med telesno maso in višino resic dvanajstnika pri korelacijskem koeficientu $r = 0,286$ ni statistično značilna pri stopnji tveganja $p < 0,1$ po T-testu. Zato z linearno regresijo ne moremo napovedati višino resic dvanajstnika z maso pujskov.

Povezava med telesno maso in višino resic dvanajstnika ni statistično značilna.

4.5.2 Tešče črevo



Slika 17: Povezava med telesno maso in višino resic teščega črevesa

$$R^2=0,164 \text{ (} r = 0,405 \text{)}$$

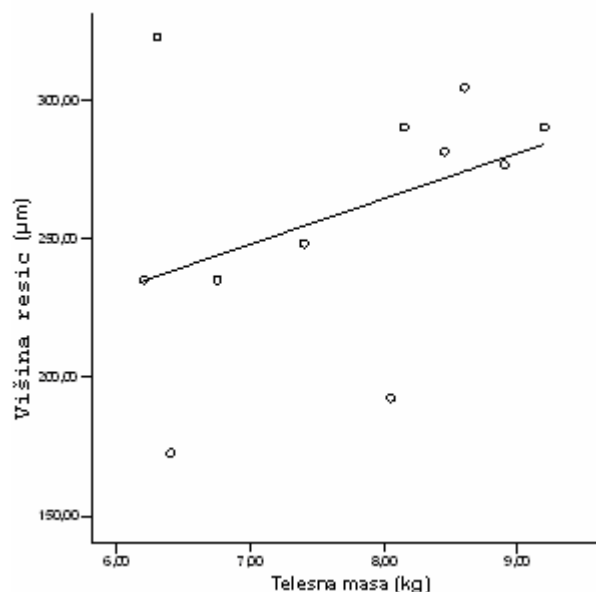
Vpliv telesne mase na višino resic lahko pojasnimo v 16,4 % z linearno funkcijo:

$$\text{Višina resic} = 171,747 + 20,6889 * \text{telesna masa}$$

Korelacija med telesno maso in višino resic teščega črevesa pri korelacijskem koeficientu $r = 0,405$ ni statistično značilna pri stopnji tveganja $p < 0,1$ po T-testu. Zato z linearno regresijo ne moremo napovedati višine črevesnih resic teščega črevesa z maso pujskov.

Povezava med telesno maso in višino resic teščega črevesa ni statistično značilna.

4.5.3 Vito črevo



Slika 18: Povezava med telesno maso in višino resic vitega črevesa

$$R^2=0,15 \text{ (} r = 0,387 \text{)}$$

15 % variabilnosti pojava lahko pojasnimo s spodnjo linearno funkcijo:

$$\text{Višina resic} = 133,114 + 16,4442 * \text{telesna masa}$$

Korelacija med telesno maso in višino resic vitega črevesa pri korelacijskem koeficientu $r = 0,387$ ni statistično značilna pri stopnji tveganja $p = 0,01$ po T-testu. Zato z linearno regresijo ne moremo napovedati višino resic z maso pujskov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Telesna masa in prirast posamezne skupine

Vpliv probiotikov na rastne parametre in zdravstveno stanje prašičev je bil opisan že velikokrat, vendar so si podatki pogosto nasprotujoči in neprimerljivi. Pozitivni vplivi na rast so bili zapaženi, kadar so probiotične bakterije dodane prašičem že prvi dan življenja, kakor tudi v obdobju odstavljanja (Chang in sod., 2001).

V našem poskusu ni bilo statistično značilnih razlik v telesni masi med skupinami. Primerjava med skupinami glede na skupni prirast in glede na prirast v posameznih obdobjih je pokazala, da v nobenem navedenem primeru ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami ($p > 0,05$), smo pa pri kontrolni skupini v 1., 3. in 4. obdobju zabeležili najnižje priraste.

Glede na to, da je v prvih 5-ih dneh poskusa le tretjina prašičev pridobila na telesni masi za 600 g in več, predpostavljamo, da se je poodstavitveni stres pojavil pri večini prašičev. Pluske (1996) je ugotavljal, da količina zaužite krme po odstavitvi ponavadi ne zadostuje za pokritje vzdrževalnih potreb prašičev. Le Dividich in Herpin (1994) sta ugotovila, da šele po 5. dnevu po odstavitvi dosežejo prašiči ustrezno metabolno energijo, potrebno za vzdrževalne potrebe. Podobno smo zabeležili hujšanje nekaterih živali od vhlevitve do 5. dne tudi v našem poskusu, ni pa bila pojava driske. McCracken in Kelly (1993) pa navajata pogostost izbruhov drisk pri zgodnjem odstavljanju, ki je posledica delovanja enterotoksigenih bakterij (najpogostejše *Echerichia coli*) v tankem črevesu in fermentacije težje prebavljivih hranil krme v debelem črevesu.

5.1.2 Sestava mikrobne združbe tankega črevesa

Prisotnost seva *L. gasseri* K7 v vsebini vitega črevesa in prisotnost seva *L. gasseri* LF221 v blatu 6 dni po prenehanju aplikacije testnih sevov kaže na to, da sta se seva sposobna zadržati dlje časa oziroma začasno naseliti v prebavnem traktu posameznih živali. Podobno so Gardiner in sod. (2004) našli laktobacile, ki so jih dajali prašičem, pri posameznih živalih 5 dni po prenehanju aplikacije. V drugih raziskavah (Simpson in sod., 2000; Gardiner in sod., 1999) so našli *L. reuteri* M53 2 dni po končani aplikaciji, *Enterococcus faecium* Fargo 688R pa tudi 8 dni po zadnjem odmerku, čeprav ne pri vseh živalih. Velika variabilnost v črevesni mikroflori med posameznimi osebki je, kakor pri živalih, značilna tudi pri ljudeh (Fujiwara in sod., 2001; Gardiner in sod., 2002). Taka razlika med osebki je posledica različne sestave črevesne sluzi, ki prekriva epitelijske celice (enterocite), ter različne sestave mikroflore, ki naseljuje črevesno sluznico. Čeprav se običajno večina zaužitih probiotičnih sevov po prekinitvi uživanja kar hitro spere iz prebavnega trakta, pa so naprimer *L. gasseri* SBT2055SR našli v blatu ljudi, vključenih v poskus, celo 90 dni po prenehanju uživanja tega seva (Fujiwara in sod., 2001).

L. gasseri LF221 in K7 sta sicer izolata iz ljudi, vendar je ta vrsta bakterij tudi običajni predstavnik mikroflore prebavil prašičev. Rezultati so pokazali sposobnost pripenjanja obeh sevov bakterij na črevesno sluznico ter pri posameznih živalih tudi vsaj začasno naselitev. Ker je znano, da se posamezne vrste bakterij ne naselijo enakomerno po vsem črevesu, je mogoče, da so bile prisotne tudi pri živalih, kjer jih nismo odkrili, saj smo analizirali le izbrane, majhne dele črevesa.

5.1.3 Višina resic

Kot je bilo pričakovano, so se višine resic od dvanajstnika prek teščega do vitega črevesa pri vseh prašičih postopoma krajšale. To je običajna anatomsko značilnost tankega črevesa prašiča, kakor tudi človeka. Podobno krajšanje višine resic vzdolž tankega črevesa je opisal tudi Pluske (1996) v delu, kjer so ugotavljali vpliv različnih krmil in količine zaužite krme na višino resic po odstavitvi.

Pričakovali bi, da se bo s povečanjem telesne mase povečala tudi višina resic. To pa zaradi tega, ker raziskave kažejo, da imajo pujski pri večjem zauživanju krme in večji telesni masi tudi višje resice. Iz izmerjenih vrednosti smo ugotovili, da so bile resice, merjene pri živalih, ki smo jih žrtvovali 20. dan, večinoma daljše od tistih, ki smo jih žrtvovali 5. dan. To sovпада z dejstvom, da se pri odstavljenih prašičih višina resic s starostjo povečuje, dokler ne doseže višine, značilne za odrasle živali. S tem pa se posredno povečuje absorpcijska površina in sama absorpcija. Krajše resice na 20. dan glede na 5. dan smo dobili pri skupini LF221 v področju vitega črevesa in pri skupini K7 v področju dvanajstnika.

Kelly (1991, cit. po Klis in Jansman, 2002) poudarja, da se v 24-ih urah po odstavitvi v tankem črevesu zgodijo strukturne in funkcionalne spremembe, kot so zmanjšanje višine resic, povečanje globine kript, zmanjšanje specifične aktivnosti prebavnih encimov laktaze in saharoze ter zmanjšanje sposobnosti absorpcije. Skrajšane resice smo v posameznih primerih sicer opazili pri vzorcih prašičev žrtvovanih 5. dan. Glede na to, da so bili vzorci odvzeti le na enem mestu posameznega dela tankega črevesa, rezultati ne odsevajo dejanskega stanja višin resic v celotnem črevesju pri posameznem prašiču. Rezultati poskusov Hempsona in Kidderja (1986) in Millerja in sod. (1986) so pokazali, da je bila povprečna višina resic vitega črevesa pri prašičih, žrtvovanih 5. dan po odstavitvi, za polovico manjša od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki so jih žrtvovali takoj ob odstavitvi. Poskus, kjer so nekaterim prašičem po odstavitvi dajali mleko oziroma mleko z glutaminom, drugim pa krmilo štarter po potrebi, je pokazal, da pri prvih ni bilo zmanjšanja višine resic in povečanja globin kript. Resice drugih pa so bile na 5. dan po odstavitvi nižje in imeli so poglobljene kripte (Pluske in sod., 1996).

Med dvema prašičema znotraj posamezne skupine, ki sta bila žrtvovana 5. oziroma 20. dan, smo v nekaterih primerih ugotovili statistično značilne razlike v višini resic posameznega dela tankega črevesa, vendar nekje v prid težjemu, drugje pa v prid lažjemu prašiču. V našem primeru so bile statistično značilne razlike pri razlikah v višini resic od 50 μm do nad 100 μm . Pluske (1996) je navedel, da je le razlika v višini resic, ki presega 95 μm , biološko signifikantna.

5.1.4 Odvisnost višine ČR od telesne mase

V našem poskusu ni bilo zaznati vpliva telesne mase na višino resic. Pri prašičih iz kontrolne skupine in skupine K7, ki so bili žrtvovani 5. dan poskusa, smo opazili, da ima težji prašič v vseh treh delih tankega črevesa daljše resice kot lažji prašič iz iste skupine. Pri ostalih prašičih pa so se ti parametri v vsakem delu črevesa zelo razlikovali. V nekaterih primerih je težji prašič imel krajše resice kot lažji iz iste skupine, kar je v nasprotju s pričakovanji.

5.2 SKLEPI

- Seva LF221 in K7 smo odkrili v črevesni sluznici posameznih živali 5 dni po začetku aplikacije, ne pa 20. dan eksperimenta, ko je minilo že 6 dni od zadnjega odmerka.
- V blatu ali vsebini črevesa posameznih živali smo našli tako sev LF221 kot K7 tudi še 6 dni po končani aplikaciji probiotikov.
- Potrdili smo hipotezo, da imata seva sposobnost pripenjanja na črevesno sluznico.
- Razlike v prirastu med skupinami prašičev niso bile statistično značilne.
- Značilnega vpliva telesne mase na višino resic nismo ugotovili za nobeno skupino.
- Ugotovili smo razlike v višini črevesnih resic posameznega dela črevesa med posameznimi prašiči, vendar razlike niso bile značilne.
- Skupina ni imela statistično značilnega vpliva na višino resic.
- Višina črevesnih resic je bila največja v dvanajstniku in najmanjša v vitem črevesu.
- Na osnovi rezultatov ne moremo potrditi hipoteze, da proučevana probiotika učinkujeta na priraščanje ali vplivata na morfometrične lastnosti resic tankega črevesa.

6 POVZETEK

Cilj našega dela je bil ugotoviti učinkovitost probiotičnih sevov LF221 in K7 pri odstavljenih prašičih. Zanimalo nas je ali aplikacija omenjenih sevov vpliva na proizvodne parametre odstavljenih pujskov ter sestavo mikrobne združbe in višino črevesnih resic v posameznem delu tankega črevesa.

Namen poskusa je bil tudi seznanitev s postopki in metodami dela za nadaljnje raziskovanje vpliva probiotičnih sevov na večjih testnih populacijah.

V poskus smo vključili 24 odstavljenih pujskov, ki smo jih naključno razdelili v tri skupine (K7, LF in kontrola) po 8 prašičev. Povprečna starost prašičev na začetku poskusa je bila 21 dni, povprečna telesna masa pa 7,25 kg. Poskus je trajal 21 dni. V tem obdobju so imeli prašiči krmo in vodo po volji, obenem pa smo dvema skupinama 2 tedna dodajali vsaki svoj probiotični pripravek. Prašiče smo 1., 6., 14. in 20. dan stehali in pri tem 6. in 20. dan izločili po dva prašiča iz vsake skupine (enega z največjim in enega z najmanjšim prirastom). Žrtvovanim prašičem smo analizirali mikrobiološko sestavo črevesne sluznice v posameznih delih tankega črevesa (dvanajstnik, tešče črevo in vito črevo) in opravili morfometrične meritve črevesnih resic istih delov črevesja.

Seva LF221 in K7 smo odkrili v črevesni sluznici posameznih živali 5 dni po začetku aplikacije, v blatu ali vsebini črevesa posameznih živali pa smo našli tako sev LF221 kot K7 še 6 dni po končani aplikaciji probiotikov. To nam potrjuje, da sta omenjena seva sposobna pripenjanja na črevesno sluznico in posledično potrjuje dobre preživetvene sposobnosti seva LF221 in K7 v prebavnem traktu.

Razlike v prirastu med skupinami prašičev niso bile statistično značilne, zato lahko sklepamo, da ni vpliva seva LF221 in K7 na rastne parametre prašičev.

Morfometrična analiza črevesnih resic nam je pokazala, da med skupinami ni statistično značilne razlike v višini resic. Pričakovano so bile najvišje resice v dvanajstniku, najnižje pa v vitem črevesu. Ugotovili smo razlike v višini črevesnih resic posameznega dela črevesa med posameznimi prašiči, vendar razlike niso bile značilne.

7 VIRI

- Baynes J., Dominiczak M.H. 1999. Biosynthesis of cholesterol in liver. V: Medical Biochemistry. L. Crowe, M. Campbell (eds.). London, Harcourt Brace & Co: 189-200
- Baynes J., Dominiczak M.H. 1999. Biosynthesis of cholesterol in liver. V: Medical Biochemistry. Crowe L., Campbell M. (eds.). London, Harcourt Brace & Co: 189-200
- Blum S., Schiffrin E.J. 2002. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: Implications for probiotic bacteria? V: Probiotics and prebiotics: Where are we going?. Tannock G. W. (ed.). Norfolk, Caister: 311-329
- Bogovič Matijašić B., Rogelj, I. 2000. Lactobacillus K7 - a new candidate for a probiotic strain. Food Technology and Biotechnology, 38: 113-119
- Bogovič Matijašić B., Stojković S., Salobir J., Malovrh Š., Rogelj, I. 2004. Evaluation of the Lactobacillus gasseri K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. Animal Research, 53: 35-44
- Bogovič Matijašić B., Narat M., Zorič Peternel M., Rogelj I. 2006. Ability of Lactobacillus gasseri K7 to inhibit Escherichia coli adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pigs' jejunal tissue. International Journal of Food Microbiology, 107, 1: 92-96
- Chang Y.H., Kim J.K., Kim H.J., Kim W.Y., Kim Y.B., Park Y.H. 2001. Selection of a potential probiotic Lactobacillus strain and subsequent in vivo studies. Antonie van Leeuwenhoek, 80: 193-199
- Černe M. 1996. Morfološke, morfometrijske in histokemične raziskave tankega črevesa pri malabsorpcijskem sindromu prašičev odstavljenecv. Doktorska disertacija. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 168 str.
- Dellmann H.D., Eurell J.A.C. 1998. Textbook of veterinary histology. 5th ed. Baltimore, Williams & Wilkins: 380 str.
- De Vuyst L., Vandamme E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. V: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. De Vuyst L., Vandamme E.J. (eds.). Glasgow, Blackie Academic and Professional: 91-142
- Ewing W.N., Cole D.J.A. 1994. The living gut. 4th ed.: An Introduction to Micro-organisms in Nutrition. Dungannon, Context: 220 str.
- 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/esn/food/wgreport2.pdf> (15. jul. 2007)

- Fujiwara S., Hashiba H., Hirota T., Forstner J.F. 2001. Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor ganglioside on the cell surface. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 97-106
- Fuller R. 1997. *Probiotics 2: applications and practical aspects*. 1st ed. London, Chapman & Hall: 212
- Fuller R. 1999. *Probiotics for farm animals*. V: *Probiotics: A critical review*. Tannock G. W. (ed.). Wymondham, Horizon Scientific Press: 15-22
- Gardiner G., Stanton C., Lynch P.B., Collins J.K., Fitzgerald G., Ross R.P. 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of Dairy Science*, 82: 1379-1387
- Gardiner G.E., Heinemann C., Baroja M.L., Bruce A.W., Beuerman D., Madrenas J., Reid G. 2002. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. *International Dairy Journal*, 12: 191-196
- Gardiner G.E., Casey P.G., Casey G., Lynch P.B., Lawlor P.G., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross R. P. 2004. Relative Ability of Orally Administered *Lactobacillus murinus* To Predominate and Persist in the Porcine Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1895-1906
- Gibson G.R., Saavedra J.M., Macfarlane S., Macfarlane G.T. 1997. *Probiotics and intestinal infections*. V: *Probiotics 2: Applications and practical aspects*. Fuller R. (ed.). London, Chapman & Hall: 10-31
- Gilliland S.E., Walker D.K. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, 73: 905-911
- Gilliland S.E. 2004. *Technological & commercial applications of lactic acid bacteria; Health & nutritional benefits in dairy products*. Department of animal science. Food & agricultural products center, Oklahoma State University, Stillwater: 15 str. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Gilli.pdf> (11. nov. 2004)
- Grill J.P., Cayuela C., Antoine J.M., Schneider F. 2000. Isolation and characterisation of *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolyse activity: relation between activity and bile salt resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 553-563

- Hempson D.J., Kidder D.E. 1986. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Research in Veterinary Science*, 47: 257-262
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. 1998. Overview of gut flora & probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101
- Huis in't Veld, J.H.J., Havenaar R. 1993. Selection criteria for microorganisms for probiotic use. V: *Probiotics and Pathogenicity*. Flair No 6. Jensen J.F., Hinton M.H., Mulder R.W.A.W. (eds.). DLO Splenderholt Centre for Poultry Research and Information Services: 11-19
- IDF standard, 100B. Milk and milk production - Enumeration of microorganisms - Colony count technique at 30°C. International Dairy Federation. 1991: 3 str.
- Konstantinov S.R., Fitzsimons N., Vaughan E. E., Akkermans A.D.L. 2002. From composition to functionality of intestinal microbial communities. V: *Probiotics and prebiotics: Where are we going?*. Tannock G. W. (ed.). Norfolk, Caister: 59-84
- Kos B. 2001. Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Dizertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet: 144 str.
- Kullen M.J., Klaenhammer T.R. 1999. Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. V: *Probiotics: A critical review*. Tannock G. W. (ed.). Wymondham, Horison Scientific Press: 65-84
- Le Dividich J., Herpin P. 1994. Effects of climatic conditions on performance, metabolism and health status of weaned pigs: a review. *Livestock Production Science*, 38: 79-90
- Lee Y.K. 2004. Mathematical Modelling of Intestinal Bacteria – Host interactions. V: *Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.). New York, Marcel Dekker: 351-363
- MacFarlane G.T., Gibson G.R. 1994. Metabolic activities of the normal colonic flora. V: *Human health: The contribution of microorganisms*. Gibson S.A.W. (ed.). London, Springer Verlag: 17-52
- McCracken K.J., Kelly D. 1993. Development of digestive function and nutrition/disease interactions in the weaned pig. V: *Recent advances in animal nutrition in Australia*. Farrell D. J. (ed.). Armidale, Australia, Department of biochemistry, microbiology and nutrition, University of New England: 182-192
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 2002. *Animal nutrition*. 6th ed. Harlow, Pearson Education Limited: 693

- Miller B.G., James P.S., Smith M.W., Bourne F.J. 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *Journal of Agricultural Science*, 107: 579-589
- Neefs J.M., Peer Y. Van de Rijk P., Champelle S., Wachter R. 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 21: 3025-3049
- Nekrep 2003. Probiotiki. Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko.
http://www.bfro.unilj.si/zoo/studij/dodipl/mikro/mibt2001/predavanje_9.htm.
(10. nov. 2003)
- Ouwehand A. C., Kirjavainen P. V., Gronlund M. M., Isolauri E., Salminen S. J. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9: 623-630
- Perko B., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2002. Production of probiotic cheese with addition of *Lactobacillus gasseri* LF221(Rifr) and K7(Rifr). *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo Zootehnika*, 80, 1: 61-70
- Pluske J. R., Williams I. H., Aherne F. X. 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Animal Science*, 62: 131-144
- Pluske, J. R., Hampson, David J., Williams, Ian H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51: 215-236
- Reid G. 1999. Testing the efficacy of probiotics. V: *Probiotics: A critical review*. Tannock G.W. (ed.). Wymondham, Horizon Scientific Press: 129-140
- Reid G. 2004. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. *FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria*. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/reid.pdf> (10. nov. 2004)
- Rojas M., Conway P. L. 1996. Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 474-480
- Salobir K., Salobir J. 1995. Prehrana in krma za prašiče. V: *Prašičje reja*. Šalehar A. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 134-200
- Sanders M.E., Huis in't Veld J.H.J. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. V: *Proceedings of the 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Leeuwenhoek A. van (eds.). The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 76: 293-316

- Simpson J.M., McCracken V.J., Gaskins H.R., Mackie R.I. 2000. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S Ribosomal DNA Amplicons To Monitor Changes in Faecal Bacterial Populations of Weaning Pigs after Introduction of *Lactobacillus reuteri* Strain MM53. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4705-4714
- Spencer R.J., Chesson A. 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 215-220
- Svensson U. 1999. Industrial perspectives. V: *Probiotics: A critical review*. Tannock G.W. (eds.). Wymondham, Horison Scientific Press: 57-64
- Tannock G.W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. V: *Probiotics: A critical review*. Tannock G.W. (eds.). Wymondham, Horison Scientific Press: 45-56
- Tannock, G.W. 2002. *Probiotics and prebiotics: Where are we going?* Norfolk, Caister: 1-40
- Van der Klis J.D., Jansman A.J.M. 2002. Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier function in monogastrics: Reality or illusion? V: *Nutrition and health of the gastrointestinal tract*. Blok M.C. (eds.). Wageningen, Wageningen Academic Publishers: 15-36
- Vesterlund S., Palta J., Karp M., Ouwehand A.C. 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Research in Microbiology*, 156: 238-244
- Zakon o krmi (ZKrmi-1). Ur.l. RS št.127-5351/06.
[2006.http://www2.gov.si/zak/Zak_vel.nsf/038acc3d5113d996c1256616002db556/c12563a400338836c1257230004afc05?OpenDocument](http://www2.gov.si/zak/Zak_vel.nsf/038acc3d5113d996c1256616002db556/c12563a400338836c1257230004afc05?OpenDocument) (12. jul. 2007)

ZAHVALA

Enkratna zahvala posameznikom se mi enostavno ne zdi dovolj. Čustvo, ki ga v resnici čutim je hvaležnost, ki ne preneha z zadnjo piko na koncu diplomskega dela. Torej naj vam povem, da sem vsem, ki ste mi kakorkoli stali ob boku do zaključka študija in sicer, iskreno hvaležen. Prav tako vsem, ki ste na svoj način pripomogli, da sem to kar sem in kjer sem. Ker pa predvidevam, da si med njimi tudi ti, ki sedaj bereš te vrstice:

Iskreno, hvala ti.