

**ACIDOFĪLO PIENSKĀBES BAKTĒRIJU
PREPARĀTA “APB-VET” IETEKME UZ GREMOŠANAS PROCESU
UN PEĻU ZARNU MIKROFLORU
LACTIC ACID BACTERIA PREPARATION „APB-VET”: INFLUENCE
ON DIGESTION AND GUT MICROFLORA OF MICE**

Gulbe Dace¹, Vija Ramniece², Saulīte Vaira²

Gaļas Higienas Servisa un Pārtikas Higienas Industrijas Uzraudzības oficiālā veterinārārstu kompānija, Latvija¹, RSUA „RSU A.Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūts”, Latvija²

GRANTS Veterinary services LTD, UK, GRANTS Veterinary services LTD, OVS
Supervision for the Meat Hygiene Service and Food Hygiene Industry for United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Latvija¹, August Kirchenshtein Institute of Microbiology and Virology, Riga Stradins University, Latvia²
dace.smiltina@hotmail.co.uk, vaira@latnet.lv

ABSTRACT

Within last 100-150 years animal nutrition used in the world and also in Latvia have changed considerably. Due to human activities and radical changes of life-style feeding stuffs have become too rich energetically. It contains less ballast substances, while it has much more chemical additives, antibiotics, pigments, preservatives, concentrates, which make difficulties for the animals digestion. This causes various functional disorders diseases (diarrhoea, allergy, decrease of immunity level, etc.). Therefore within last 2 – 3 decades the issues concerning natural feed additives, and among them probiotics, had been discussed.

Probiotic preparation “APB – Vet” was registered in Latvia in 1997 to be used for animals. It contain up to 200 – 500 millions of live cells, propagated in the modified skim milk culture medium and then frozen (from -18 to -24°C), realization time 3 months for frozen form.

The aim of the present study was to find out how lactic acid bacteria *Lactobacillus spp.* preparation “APB-Vet” affects digestion and flora of small intestine of BALB/C mice, according to microbiological, pathologic-anatomical and functional evaluation.

Standard methods, developed on the base of ISO and those worked out in Latvia, which enable to evaluate the qualitative and quantitative indicators, are generally used for research.

The research shows that the normal flora of small intestine of BALB/C mice consists of non-pathogenic *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* (correlation of which is 1:1 or 10⁵ PFU/g), mould (10⁴ PFU/g) and lactic acid bacteria (10⁷ PFU/g). Prophylactic dose (2 g/kg of live weight) of lactic acid bacteria *Lactobacillus spp.* preparation “APB-Vet” facilitates more feed digestion in the small intestine, resorption of nutrients in the gut, consuming less amount of basic feed (granulated provender), as well as promotes more rapid increase of live weight.

Preparation decreases the number of non-pathogenic *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* up to 10³ PFU/g on average, while increases the number of lactic acid bacteria up to 10⁸ -10⁹ PFU/g. This proves that the preparation functions as probiotics.

The results of the study show that the preparation had produced a dietary effect on animals, because BALB/C mice did not have subcutaneous fat after the use of preparation.

The results of the pathologic-anatomical examination of mice show that the morphology of viscera is normalized.

KEY WORDS: animal, friendly lactic acid bacteria, nutrition, health.

IEVADS

Ja attiecībā uz cilvēku jau ir radusies izpratne, ka daudzviet ķīmisku preparātu vietā labāk ir lietot dabiskas izcelsmes uztura bagātinātājus, tad lopkopībā šis process ir pašā sākumstadijā, kas viennozīmīgi būtu jāattīsta un jāievieš maksimāli plaši.

Pasaulē potenciālā augšanu veicinošo antibiotoku izņemšana no lauksaimniecības un citu dzīvnieku barības nākotnē ir atjaunojusi interesi par dzīvo mikrobioloģisko pienskābes kultūru kā vispārēju veselības stāvokļa stabilizējošu un augšanu veicinošu aģentu

izmantošanu, papildus tam, ka pašreiz šīs kultūras dzīvniekiem izmanto pārsvarā zarnu slimību kontrolei.

Latvijas Universitātes (tagad – Rīgas Stradiņa Universitātes) A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūtā 20. gadsimta 90. gados Vijas Ramnieces vadībā tika izveidots acidofilo pienskābes baktēriju preparāts “APB-Vet”, kurš satur 200-500 miljonus /ml dzīvu, sasaldētu pienskābes baktēriju *Lactobacillus spp.* šūnu, kuras savairotas modificēta vājpiena barotnē.

1997. gadā šim preparātam izsniegta licence lietošanai dzīvniekiem.

Šī darba mērķis bija: noskaidrot acidofilo pienskābes baktēriju preparāta “APB-VET” ietekmi uz BALB/c peļu gremošanu un tievo zarnu mikrofloru gan funkcionāli, gan mikrobioloģiski un patologanatomiski.

Darba uzdevumi:

1. pārbaudīt peļu barības “R-3”(Somija) mikrobioloģisko tīrību;
2. noskaidrot BALB/C peļu:
 - barības patēriņu diennaktī;
 - dzīvmasu;
 - tievo zarnu masas svaru;
 - tievo zarnu mikrofloras sastāvu kvalitatīvi un kvantitatīvi.
3. novērtēt BALB/C pelēm pēc piebarošanas ar acidofilo pienskābes preparātu “APB-VET” un inficēšanas orāli ar *Salmonella typhimurium* :
 - ķermeņa un tievo zarnu satura masas korelācijas;
 - enterobaktēriju, pienskābes baktēriju skaita izmaiņas;
 - funkcionālaas un patologanatomiskaas izmaiņas.

MATERIĀLI UN METODES

Izmantotās mikroorganismu kultūras:

1. *Lactobacillus spp.*, kas savairotas modificētā vājpiena barotnē (200 – 500 milj.KV / 1,0 ml) un uzglabātas sasaldētā veidā (no -18°C līdz -24°C)
2. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Baktēriju kultivēšanai (identificēšanai un to skaita noteikšanai) no peļu tievajām zarnām tika izmantotas agarizētās un šķidrās barotnes, veicot uzskējumus no atšķaidījumiem, izmantojot modificētas un ISO standartmetodes.

Baktēriju kopskaits 1,0 g tika noteikts pēc ISO 4833 – 1991 (Plate Count agar) ; *E.coli* un citas enterobaktērijas un to skaits 1,0 g – pēc ISO 7402 – 1985 (E) (Violet Red Bile Glucose agar) ; *Lactobacillus spp.* un to skaits 1,0 g – pēc ISO 15214 – 1998 (MRS agar, GENbox) ; enterokoki un to skaits 1,0 g – pēc modificētas metodes (enterokoku uzkrāšanas Azīda barotnē un Slanetz & Bartley agarā) ; raugi un to skaits 1,0 g - pēc modificētas metodes (rauga ekstrakta – glukozes hloramfenikola agars).

Par izmēģinājumu modeli tika izmantotas 240 BALB/C peles ar dzīvmasu 25,0 g. Eksperimenta grupā (A grupa) bija 180 peles, kontrolgrupā (B grupa)- 60 peles. Abas grupas regulāri nodrošināja ar dzeramo ūdeni un peļu granulēto barību R-3, kas ražota Somijā. A grupas peles 30 dienas vienā un tajā pašā laikā perorāli tika piebarotas ar acidofilo pienskābes baktēriju preparāta “APB-VET” profilaktisku devu – 0,1 ml vienai pelei (2,0 g / kg dzīvmasas).

Eksperimentālā ēdināšanas perioda 30. dienā un nākamajās dienās tika ņemtas pa 10 pelēm no katras grupas (B un A) , noteica dzīvsvāru, veica eitanāziju un sekciju, iegūstot eksperimentālo materiālu mikrobioloģisko pētījumu veikšanai – tievo zarnu saturu.

Eksperimenta 63.dienā grupu B un A peles tika sadalītas attiecīgi pa grupām BS un BSA, AS un ASA ; un visas šo grupu peles tika inficētas ar *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ($2,7 \times 10^7$ KVV / 1 pelei).

Darba shēma / Scheme of the study :

Kontrolgrupa B Control group B		Eksperimenta grupa A/Experimental group A	
↗	↘	↗	↘
BS	BSA	AS	ASA

- **BS** - B grupas peles (n=10), kuras inficēs orāli ar *S. typhimurium*
Mice to be infected orally with *S. typhimurium*
 - **BSA** - B grupas peles (n=10), kuras inficēs orāli ar *S. typhimurium* un piebaros ar APB-Vet
Mice to be infected orally with *S. typhimurium* and to receive APB-Vet
- Peles no viena A grupas sprostā (n=20) sadala 2 daļās / Mice from one group A cage were divided in two parts:
- **AS** - grupas peles (n=10), kuras inficēs orāli ar *S. typhimurium*
Mice to be infected orally with *S. typhimurium*
 - **ASA** - A grupas peles (n=10), kuras inficēs orāli ar *S. typhimurium* un piebaros ar APB-Vet
Mice to be infected orally with *S. typhimurium* and to receive APB-Vet

BSA un ASA grupu peles pēc inficēšanas reizi dienā piebaroja ar "APB-VET" preparātu ārstnieciskā devā jeb 8,0 g/kg dzīvmasas. Eitanāziju visām inficētajām pelēm veica 7.dienā pēc inficēšanas, kad kontrolgrupā BS vienai pelei parādījās hemorāģiska diareja.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Peļu granulētā barība R-3 tika izmeklēta laboratoriski, lai pārlicinātos par tās mikrobioloģisko tīrību. Rezultāti parāda, ka ir konstatēti pelējumi 10^2 pakāpē, kas liecina par šīs barības piesārņotību ar pelējumiem, kuri var ietekmēt peļu veselības stāvokli

Izvērtējot patērētās granulētās barības daudzumu diennaktī vidēji uz vienu peli, konstatēts, ka pēc vidējiem rādītājiem A grupas 1 pele apēd (3,44 g) par 1,05 g jeb 24% mazāk (-1,05g) nekā B grupas 1 pele (4,49 g).

Par to liecina arī peļu tievajās zarnās esošais barības masu daudzums – A grupas 1 pelei vidēji tas par 47% mazāks (-0,24 g) nekā B grupas 1 pelei. Bet tajā pašā laikā A grupas 1 peles vidējais dzīvmasas pieaugums ir par 7,4% lielāks (+2,35 g) nekā B grupas 1 pelei. Fizioloģiski izvērtējot, eksperimentālās (A) grupas peles pēc preparāta piebarošanas kļuva aktīvākas, kustīgākas.

Pēc BALB/C peļu inficēšanas ar *Salmonella typhimurium* novēroja straujus ķermeņa masas zudumus - 7 dienu laikā:

- BS grupas 1 pele vidēji zaudēja 10,21 g, jeb 31% no ķermeņa masas ;
- BSA grupas 1 pele vidēji zaudēja 10,68 g, jeb 33% no ķermeņa masas ;
- AS grupas 1 pele vidēji zaudēja 8,48 g, jeb 26% no ķermeņa masas ;
- ASA grupas 1 pele vidēji zaudēja 7,65 g, jeb 22% no ķermeņa masas.

BALB/C peļu tievo zarnu mikroflora salīdzinoši ar cilvēka tievo zarnu mikrofloru ir "nabadzīgāka"- tajā nav konstatētas *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, no *Streptococcus spp.* izdaliiti tikai *Enterococcus faecalis* vidēji 10^3 pakāpē KVV; no *Enterobacteriaceae* ir konstatēta tikai *Escherichia coli I* nepatogēnais celms 10^5 pakāpē KVV; pelējumi – *Mucor spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Margaritispota spp.* – vidēji 10^4 pakāpē KVV, kā arī pienskābes baktērijas – vidēji 10^7 pakāpē KVV.

Pēc "APB-VET" piebarošanas proporcionāli izmainījās sekojošu baktēriju skaits :

- *E.coli I* – vidēji samazinās par 10^2 pakāpi; 50.eksperimenta dienā – samazinās par 10^3 pakāpi;
- Pienskābes baktērijas – vidēji palielinās par 10^1 pakāpi; 50.eksperimenta dienā – palielinās par 10^2 pakāpi;

- Baktēriju kopskaits (1,0 g tievo zarnu satura masas) preparāta probiotiskās ietekmes dēļ jau 30. dienā samazinās A grupā par 11,6% (no 10^6 uz 10^5 KVV) ;

Pelējumu skaita izmaiņas novēroja 50. eksperimenta dienā, kad attiecībā pret kontrolgrupas B vidējo rādītāju pakāpi (10^4 KVV) 30. eksperimenta dienā A grupai taa bija + 10^1 pakāpē (10^5 KVV). Ap pelējumiem bieži tika novērota dzidra zona, kas liecina par to antimikrobiālo iedarbību.

50. diena ir vērojama kā galējais krustpunkts dažādu mikroorganismu simbiozē :

- Maksimāli augsts pienskābes baktēriju skaits (līdz 10^9 pakāpei KVV) ;
- Minimāli zems nepatogēno *E.Coli I* un *Enterococcus faecalis* līmenis (no 1 KVV līdz 10^2 KVV) ;
- Par 10^1 pakāpi paaugstināts pelējumu skaits (10^5 KVV).

Peļu inficēšana ar *Salmonella typhimurium* izraisa straujas, acīmredzamas izmaiņas arī iekšējos orgānos – it īpaši aknās, kā arī zarnu mikrofloras kvantitatīvajā izteiksmē. Bet acidofilo pienskābes baktēriju ietekmē BALB /C peļu zarnu mikrofloras sastāvu izdodas noturēt līdzsvarā, kas ir tuvs normālajiem zarnu mikrofloras sastāva rādītājiem.

Patologanotomiski izmeklējot, izdarot BALB / C peļu līķu sekciju, konstatēts, ka vairāk vai mazāk skarti visi iekšējie orgāni - vismazāk sirds, bet visgraužošāk *Salmonella typhimurium* un tās izdalītie toksīni iespaidoja aknu izskatu. Tajās vērojamas distrofiskas izmaiņas, tās kļūst dzeltenas vai pelēkas ar sīkām paratifožām granulomām sīku, pelēkbaltu mezgliņu veidā. Tievajās zarnās iekaisuma pazīmes vērojamas retāk, bet resnajās zarnās iekaisuma pazīmes ir izteiktākas.

Uzmanību saista BALB / C peļu ķermeņu novājējums.

SECINĀJUMI

1. Acidofilo pienskābes baktēriju preparāta "APB – VET" piebarošana :
 - sekmē ātrāku barības masu pārstrādi BALB/C peļu gastrointestinālajā traktā;
 - sekmē straujāku barības vielu uzsūkšanos tievajās zarnās;
 - sekmē pamatbarības daudzuma mazāku patēriņu peļu uzturā;
 - sekmē straujāku dzīvnieku dzīvmasas pieaugumu;
 - ļauj organismam racionālāk izmantot barību.
2. BALB/C peļu gastrointestinālā trakta normālā mikroflora sastāv no nelielas baktēriju populācijas: nepatogēnā *E.coli* un *Enterococcus faecalis* (attiecība 1:1 jeb 10^5 KVV), pelējumi 10^4 KVV (*Mucorales sp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Margaritispora spp.*).
3. Preparāta "APB–VET" lietošana uzturā stabilizē peļu tievo zarnu mikrofloru:
 - manāmi samazina *Enterococcus faecalis* un nepatogēnā *Escherichia coli I* skaitu;
 - palielina pienskābes baktēriju un nedaudz arī pelējumu skaitu.
4. Pelēm, kurām acidofilo pienskābes baktēriju preparātu "APB–VET" piebaroja ārstnieciskajā devā pēc inficēšanas ar *Salmonella typhimurium*, tievo zarnu mikrofloras dabīgais mikrobioloģiskais sastāvs (*Enterobacteriaceae* un pienskābes baktērijas) saglabājas pirmsinficēšanas līmenī.

LITERATŪRA

1. Collins M.D., Gibson G.R., Probiotics, prebiotics and synbiotics : approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am.J.Clin.Nutr., 1999, 69,1052S-1057S.
2. Sherwood L., Gorbach M.D., Probiotics and Gastrointestinal Health. Amer.J.Gastroent.,2000,95(1), S2-S4.
3. Gulbe D. Maģistra darbs, LU BF, Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedra, 95 lp. 2002.

4. Ramniece V., Saulīte V., Rože S., Gulbe D. Acidofilo pienskābes baktēriju preparāta APB-Vet lietošana mazo dzīvnieku veterinārajā praksē un pētījumos ar BALB/C pelēm. Veterinārais žurnāls 2 (63) 2003, 24-26.
-