

**LACTOBACILLUS FERMENTUM KULTŪRAS PERORĀLAS PIELIETOŠANAS
EFEKTIVITĀTE AR SUBAKŪTO SPUREKĻA ACIDOZI SLIMĀM SLAUCAMAJĀM GOVĪM
EFFICIENCY OF PERORALY ADMINISTERED CULTURE OF LACTOBACILLUS FERMENTUM
TO THE SUBACUTE RUMEN ACIDOSIS AFFECTED COWS**

Laima Liepa¹, Māra Viduža²

¹Latvijas Lauksaimniecības universitāte, Veterinārmedicīnas fakultāte; ²Latvijas Veterinārārstu biedrība
laima.liepa@llu.lv

Abstract. The culture of *Lactobacillus fermentum* was isolated from the biogas substrate within the framework of the State Research Project (AgroBioRes) No. 2014.10-4/VPP-7/5. The aim was to evaluate the efficiency of perorally applied *L. fermentum* additive to control subacute rumen acidosis in a dairy herd. The experiment was performed in an early lactation group in the herd of 240 dairy cows. A control (C) and an experimental (E) group consisted of 10 cows each with milk fat/protein ratio 0.95–1.13, milk fat below 3.00%. On days 1–5 (D1–D5), E cows received orally 150 mL of *L. fermentum* product of 8.1×10^5 KVV mL⁻¹. On D1, D2, D5 and D20, the rumen fluid samples were collected from all animals in both groups with an oesophageal rumen probe once per day for detection of pH and concentration of volatile fatty acids, but on D1, D5 and D20 blood samples for biochemical analyses were collected. The data were analysed using Microsoft Excel. The results showed that significant changes in the concentration of the liver enzymes AST and GGT. On D1, E animals AST concentration was significantly ($p < 0.05$) higher 100.5 ± 14.0 IU L⁻¹ than C cows – 51.4 ± 5.7 IU L⁻¹. On D20, AST reduced significantly only in E cows – 40.6 ± 5.07 IU L⁻¹. GGT concentration in E animals on D1 was significantly ($p < 0.05$) higher 31.5 ± 6.91 IU L⁻¹ than in C cows – 13.6 ± 1.53 IU L⁻¹, but on D5 GGT concentration of E animals reduced significantly ($p < 0.05$) to 18.4 ± 6.41 IU L⁻¹, and remained to D20. The conclusion is that *L. fermentum* culture administered orally for five days improved the blood liver enzymes in cows, and the effect lasted for two weeks.

Key words: *L. fermentum*, AST, GGT, subacute rumen acidosis.

Ievads

Subakūtā spurekļa acidoze (SARA) ir viena no Latvijas augstāzīgo govju ganāmpulkos sastopamajām vielmaiņas slimībām, ko izraisa augstas koncentrētās barības izēdināšana vai ēdināšanas darba organizācijas kļūdas. Probiotikas (baktērijas, raugi un sēnes), ko lieto kā barības piedevas govju ēdināšanā agrā laktācijas periodā vislabāk palīdz spurekļa un zarnu trakta mikrobiālā sastāva līdzsvarošanā, kad govīs cieš no negatīvas enerģijas bilances, pat pie augsta koncentrētās barības īpatsvara (Kung, 2001). *Lactobacillus fermentum* ir heterofermentatīvas, grampozitīvas, nesporulējošas baktērijas ar antioksidatīvu un antimikrobiālu darbību, kuru nozīme līdz šim pētīta tikai cilvēku un dažu sugu dzīvnieku gremošanas traktā. Tās var būt gastrointestinālā trakta fizioloģiskajā mikrobiota sastāvā (Uyeno et al., 2015). Humānās izcelsmes *L. fermentum* celmam ME-3 ir pozitīva iedarbība uz gremošanas trakta mikrobiotu, jo samazina gram-negatīvo baktēriju (*Salmonella spp.*, *Enterococcus spp.* un *Staphylococcus aureus*) attīstību (Mikelsaar and Mihkel, 2009). *L. fermentum* kultūra cilvēkiem mazina urīntrakta iekaisumu, bet, kombinācijā ar *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, samazina aknu mazspējas simptomus žurkām (samazina ALAT koncentrāciju serumā), samazina zarnu šūnās enterotoksīnu caurlaidību, citokīnu sekrēciju un iekaisuma pazīmes (Adawi, 1997; Xing et al., 2006). Tomēr zinātniskajā literatūrā nav atrodami pētījumi par *L. fermentum* kultūras iedarbību uz govju gremošanas traktu, fizioloģiskajiem rādītājiem un izslaukumu. Mūsu pētījuma mērķis – noskaidrot iekšēji pielietotas *L. fermentum* kultūras iedarbības efektivitāti slaucamo govju subakūtās spurekļa acidozes simptomu mazināšanā.

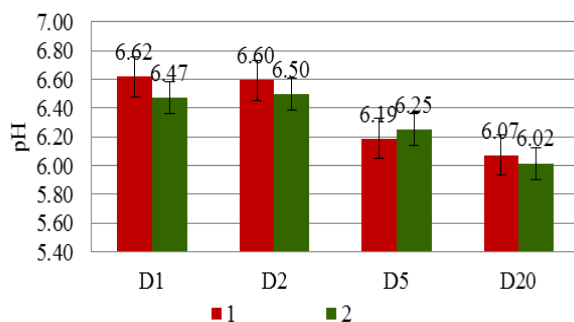
Materiāli un metodes

Pirms eksperimenta uzsākšanas 2015. gada vasarā Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģiju institūta laboratorijā tika izolēta *L. fermentum* kultūra no biogāzes reaktora substrāta un pavairota iesala barotnē. Priekšeksperimentos ar slaucamajām govīm ir noskaidrota probiotikas efektīvā deva. Eksperiments veikts SARA skartā 240 slaucamo govju novietnē, izslaukuma kāpinājuma grupā. Eksperimenta (E) un kontroles (K) grupās iekļautas pa 10 govīm ar izslaukumu 30–40 kg piena dienā, kam piena tauku/olbaltumvielu attiecība bijusi robežās no 0.95 līdz 1.13. E govīm 1.–5. dienā (D1–D5) izēdināta iesala barotnē kultivēta *L. fermentum* kultūra 8.1×10^5 KVV mL⁻¹ koncentrācijā, kas pirms orālās ievadīšanas atšķaidīta ar dzeramo ūdeni līdz 150 mL, K grupas govīm tajā pašā laikā orāli tika ievadīts 150 mL dzeramā ūdens. Abu grupu dzīvniekiem ar ezofagorumenālo zondi noņemti spurekļa satura paraugi D1, D2, D5 un D20

(pirms probiotiku ievadīšanas), un tajos noteikts pH un gaistošo taukskābju % sastāvs. Asins bioķīmiskajiem un hematoloģiskajiem izmeklējumiem E un K grupas dzīvniekiem asins paraugi noņemti eksperimenta D1, D5 un D20. Visi iegūtie asins un spurekļa satura paraugi uzglabāti sasaldētā veidā un analizēti LLU Universitātes Veterinārās klīnikas bioķīmijas laboratorijā un LLU Biotehnoloģiju zinātniskās laboratorijas Agronomisko analīžu nodaļā. Piena paraugi iegūti eksperimenta D1, D5 un D20, un analizēti AS Siguldas CMAS Piena kvalitātes kontroles laboratorijā. Datu statistiskā analīze veikta, izmantojot *Microsoft Excel* datu analīzes rīkus (Anova, vienfaktora dispersiju analīze). Rakstā rezultātu salīdzināšanā pielietots būtiskuma līmenis $p < 0.05$.

Rezultāti un diskusijas

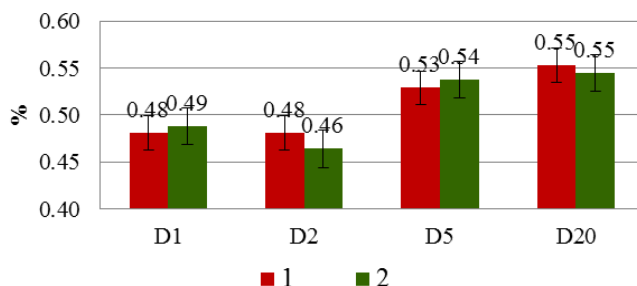
Spurekļa satura skābums visu eksperimenta laiku abās pētījuma grupās ir bijis fizioloģiskās normas robežās (pH virs 6.0) (Wang et al., 2013); arī spurekļa satura etiķskābes un sviestskābes koncentrācijas atšķirības starp grupām D1, D2, D5 un D20 ir bijušas nebūtiskas (skat. 1. un 2. att.), taču pienskābes koncentrācija vairāk izmainījies E grupā.



1. att. Spurekļa satura pH līmeņa izmaiņas: 1 – kontroles grupa, 2 – eksperimenta grupa, D1, D2, D5, D20 – pētījuma dienas.

Fig 1. Alterations of the levels of rumen content pH: 1 – Control group, 2 – Experimental group, D1, D2, D5, D20 – days of experiment.

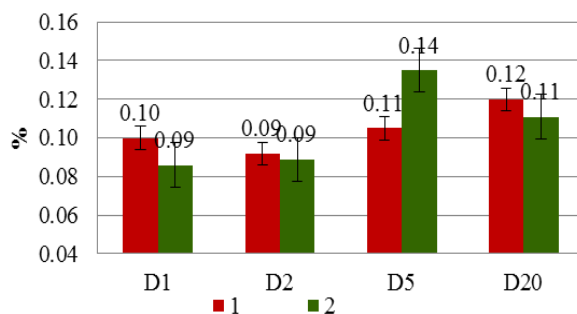
Etiķskābes saturs, uzsākot pētījumu D1, abām grupām bijis līdzīgs – K grupai $0.48 \pm 0.02\%$, E grupai $0.49 \pm 0.02\%$, D20 etiķskābes koncentrācija abās grupās ir nebūtiski paaugstinājusies: K grupā – $0.55 \pm 0.03\%$, E grupā – $0.55 \pm 0.01\%$ (skat. 2. att.).



2. att. Etiķskābes koncentrācijas izmaiņas spurekļa saturā: 1 – kontroles grupa, 2 – eksperimenta grupa, D1, D2, D5, D20 – pētījuma dienas.

Fig 2. The concentration alterations of acetic acid in the rumen content: 1 – Control group, 2 – Experimental group, D1, D2, D5, D20 – days of experiment.

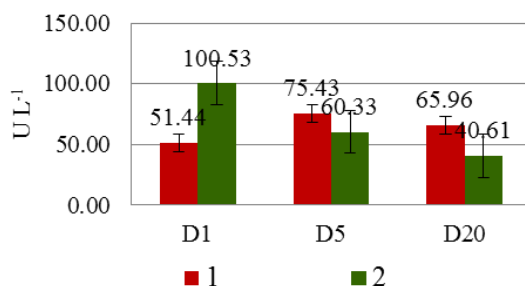
Pienskābes saturs K grupai visā pētījuma laikā bijis stabils D1 – $0.10 \pm 0.01\%$, D2 – $0.09 \pm 0.01\%$, D5 – $0.11 \pm 0.01\%$, E grupai D1 un D2 – $0.09 \pm 0.01\%$ novērots nebūtisks koncentrācijas pieaugums, taču D5 ($0.14 \pm 0.01\%$) tas bijis būtiski augstāks nekā K grupā ($p < 0.05$). Tomēr līdz D20 pienskābes līmenis ir samazinājies $0.11 \pm 0.01\%$, un bijis pat nebūtiski zemāks kā K grupā. Pienskābes koncentrācijas pieaugums E grupā D5 varētu liecināt par baktērijas adaptēšanos spurekļa saturā (skat. 3. att.).



3. att. Pienskābes koncentrācijas izmaiņas spurekļa saturā: 1 – kontroles grupa, 2 – eksperimenta grupa, D1, D2, D5, D20 – pētījuma dienas.

Fig 3. The concentration alterations of lactic acid in the rumen content: 1 – Control group, 2 – Experimental group, D1, D2, D5, D20 – days of experiment.

Asins bioķīmiskajos rādītājos būtiskas izmaiņas konstatētas aknu testos: aspartātaminotransferāzes (ASAT) un gamma-glutamīltransferāzes (GGT) koncentrācijā. E govīm ASAT koncentrācija pirms *L. fermentum* kultūras ievadīšanas bijusi $100.50 \pm 14.01 \text{ U L}^{-1}$, kas ir bijusi būtiski augstāka ($p < 0.05$) nekā K grupā – $51.40 \pm 5.72 \text{ U L}^{-1}$. Savukārt, pētījuma D20 ASAT koncentrācija K govīm – $66.00 \pm 11.73 \text{ U L}^{-1}$ ir bijusi būtiski augstāka ($p < 0.05$), nekā E govīm – $40.60 \pm 5.07 \text{ U L}^{-1}$ (skat. 4. att.).



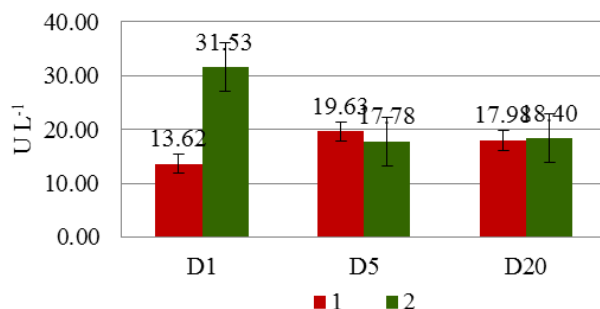
4. att. ASAT koncentrācijas izmaiņas govju asins serumā: 1 – kontroles grupa, 2 – eksperimenta grupa, D1, D5, D20 – pētījuma dienas.

Fig 4. The concentration alterations of serum AST: 1 - Control group, 2 – Experimental group, D1, D5, D20 – days of experiment.

K govīm GGT koncentrācija nav būtiski mainījusies eksperimenta laikā – D1 tā bijusi $13.60 \pm 1.53 \text{ U L}^{-1}$ un D20 – $17.98 \pm 4.11 \text{ U L}^{-1}$, bet E govīm D1 pirms produkta saņemšanas GGT koncentrācija asins serumā bijusi būtiski ($p < 0.05$) augstāka $31.50 \pm 6.91 \text{ U L}^{-1}$, nekā K grupā, bet D5 E govīm GGT koncentrācija ir būtiski ($p < 0.05$) samazinājusies līdz $18.40 \pm 6.41 \text{ U L}^{-1}$, un sasniegtais efekts saglabājies līdz D20 – $21.55 \pm 7.68 \text{ U L}^{-1}$ (skat. 5. att.).

Asins serumā noteiktais glikozes līmenis K un E grupai eksperimenta laikā ir bijis fizioloģiskās normas robežās ($2.2\text{--}3.3 \text{ mmol L}^{-1}$) (Khan, 2005). E grupai D1 glikozes līmenis asinīs bijis $2.89 \pm 0.10 \text{ mmol L}^{-1}$, pēc *L. fermentum* uzņemšanas D5 – $3.35 \pm 0.13 \text{ mmol L}^{-1}$, bet D20 – $3.15 \pm 0.10 \text{ mmol L}^{-1}$.

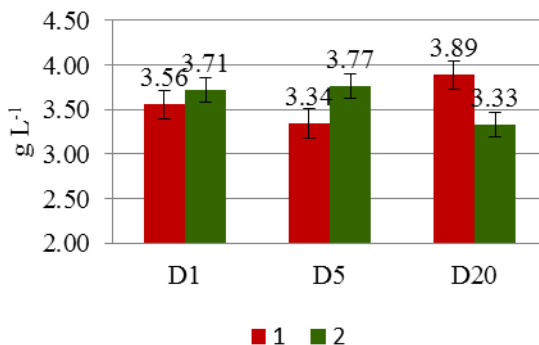
Spriežot pēc aknu enzīmu izmaiņām, *L. fermentum* kultūra ir būtiski uzlabojusi hepatocītu morfoloģisko stāvokli un samazinājusi holestāzi aknās. Spurekļa šķidrumā *L. fermentum* adaptācijas rezultātā, palielinājusies D–pienskābes veidošanās, kas, absorbējoties asinīs, veicina L–pienskābes aizturi asinīs (Hernández et al., 2014). L–pienskābe ar L–laktātdehidrogenāzes palīdzību aknās viegli metabolizējas par piruvātu, kas glikoģenēzes procesā pārvēršas par glikozi.



5. att. GGT koncentrācijas izmaiņas govju asins serumā: 1 – kontroles grupa, 2 – eksperimenta grupa, D1, D5, D20 – pētījuma dienas.

Fig 5. The concentration alterations of serum GGT: 1 – Control group, 2 – Experimental group, D1, D5, D20 – days of experiment.

Glikoze ir nepieciešama bioķīmiskajās reakcijās, kas samazina tauku rezervju izmantošanu enerģijas nodrošināšanā organismā, un tādējādi samazina aknu lipidozes veidošanās risku. Savukārt, aknu lipidozes gadījumā glikoze ir nepieciešama, lai veidotos ļoti zema blīvuma lipopolisaharīdi, kas izvada no aknām triglicerīdus (Khan, 2005). No zinātniskās literatūras zināms, ka agrā laktācijas fāzē SARA skartajām govīm bieži ir konstatējamas aknu slimības (Hernández et al, 2014). Tāpēc var secināt, ka *L. fermentum* barības piedevas palīdz mazināt SARA izraisītās komplikācijas.

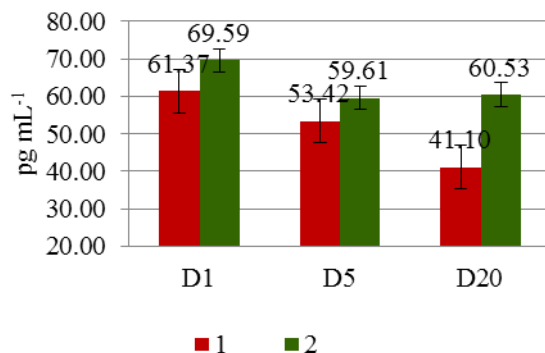


6. att. Haptoglobīna līmeņa izmaiņas asins serumā: 1 – kontroles grupa, 2 – eksperimenta grupa, D1, D5, D20 – pētījuma dienas.

Fig. 6. The concentration alterations of serum haptoglobins: 1 – Control group, 2 – Experimental group, D1, D5, D20 – experiment days.

E grupas govīm D1 haptoglobīna (skat. 6. att.) līmenis bija 3.7 ± 0.23 ng mL⁻¹, K grupas govīm – 3.6 ± 0.15 ng mL⁻¹. Taču E grupas govīm D20 šis rādītājs ir būtiski ($p < 0.05$) pazeminājies – 3.3 ± 0.23 ng mL⁻¹. K grupas govīm D20 tas ir bijis 3.9 ± 0.16 ng mL⁻¹. Iespējams, ka, ja *L. fermentum* kultūras darbības ietekmē aknu funkcijas uzlabojas, tiek samazināta iekaisuma proteīnu sintēze aknās D5–D20, t.i., samazinās seruma haptoglobīna koncentrācija E grupas govīm. Taču iekaisuma citokīna TNF- α koncentrācijas izmaiņas ir vērojamas jau *L. fermentum* kultūras izēdināšanas laikā D1–D5 (skat. 7. att.).

E grupā D1 audzēju nekrozes faktors (TNF- α) bijis nebūtiski ($p > 0.05$) augstāks 69.60 ± 18.92 pg mL⁻¹ kā K grupā 61.40 ± 15.92 pg mL⁻¹; D5 E grupai novērota būtiska ($p < 0.05$) TNF- α pazemināšanās līdz 59.60 ± 11.99 pg mL⁻¹, kas saglabājusies līdz D20 60.50 ± 18.89 pg mL⁻¹. Savukārt, K grupas govīm TNF- α koncentrācija D20 samazinājusies līdz 41.10 ± 8.89 pg mL⁻¹. Zinātniskajā literatūrā norādītā TNF- α fizioloģiskā norma ir plašā amplitūdā, kā tas ir konstatēts arī mūsu pētījumā – no 16.10 līdz 223.30 pg mL⁻¹ (Khan, 2005).



7. att. Audzēju nekrozes faktora alfa (TNF- α) daudzuma izmaiņas asins serumā: 1 – kontroles grupa, 2 – eksperimenta grupa, D1, D5, D20 – pētījuma dienas.

Fig 7. The concentration alterations of serum tumor necrosis factor alpha (TNF- α): 1 – Control group, 2 – Experimental group, D1, D5, D20 – experiment days.

Iegūtie pētījuma rezultāti ir zinātniski nozīmīgi un eksperimenti turpināti Valsts pētījumu programmā (AgroBioRes) vēl 2016. un 2017. gadā.

Secinājumi

L. fermentum kultūras izēdināšana piecu dienu periodā būtiski ir uzlabojusi aknu enzīmu koncentrāciju SARA skartām govīm un nodrošinājusi sasniegto efektu vēl 2 nedēļas pēc produkta izēdināšanas.

Pateicība. Eksperiments veikts Valsts pētījumu programmā (AgroBioRes) No. 2014.10–4/VPP–7/5, un pētījumi ir turpināti 2016. un 2017. gadā.

Izmantotā literatūra

- Adawi D., Kasravi F.B., Molin G., Jeppsson B. (1997). Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat. *Hepatology*, Vol. 25(3), p. 642–647.
- Hernández J., Benedito J.L., Abuelo A., et al. (2014). Ruminant Acidosis in Feedlot: From Aetiology to Prevention. *The Scientific World Journal*, Vol. 22(3), p. 124–130.
- Mikelsaar M., Mihkel Z. (2009). *Lactobacillus fermentum* ME-3 an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb Ecol Health Dis*, Vol. 21(1), p. 1–27.
- Khan C.M. (2005). *The Merck Veterinary Manual*. Ninth edition. Whitehouse station, N.J.: Merial Ltd. 2712 p.
- Kung L. (2001). Direct-fed microbials for dairy cows and enzymes for lactating dairy cows: New theories and applications. **In:** *Proceeding of the Pennsylvania State Dairy Cattle Nutrition Workshop*. Grantville: Pennsylvania State, USA, p. 86–102.
- Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. (2015). Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environment*, Vol. 30(2), p.126–132.
- Xing H.C., Li L.J., Xu K.J., Shen T., Chen YB, Sheng J.F., Chen Y, Fu S.Z., Chen C.L., Wang J.G., Yan D., Dai F.W., Zheng S.S. (2006). Protective role of supplement with foreign *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 21(4), p. 647–656.
- Wang D.S., Zhang R.Y., Zhu W.Y., Mao S.Y. (2013). Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and biogenic amines in the rumen of dairy cows. *Livestock Science*, Vol. 155(2–3), p. 262–272.