

THE EFFECT OF PROBIOTICS CULTURES ON *ESCHERICHIA COLI* AND *CLOSTRIDIUM* COUNTS IN INTESTINAL TRACT OF PIGLETS

VLIV PROBIOTICKÝCH KULTUR NA POČTY BAKTERIÍ *ESCHERICHIA COLI* A *CLOSTRIDIUM* VE STŘEVNÍM TRAKTU SELAT

Kolářová M., Sládková P., Zorníková G.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkolaro1@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the efficiency of probiotics cultures in intestinal tract of piglets. Three groups of piglets were fed with and without probiotic (two groups with and one control group without). For this experiment was used 10 healthy piglets in each group. The first group was fed probiotic *Enterococcus faecium* DSM 7134 and the second group EM-EKO ProBio original with mixture probiotics cultures. All groups were fed identically for first three weeks of rearing. For two experimental groups were given probiotic since 4 weeks. Fecal samples were collected at days: 0 (without consumption), 15 (during consumption) and 30 (end consumption). Fecal samples were collected in sterile sample containers.

From this experiment was evident in both experimental groups (P1, P2) consuming probiotics to reduce the total number of potential pathogens species *Escherichia coli* and genus *Clostridium*. This effect was more pronounced the experimental group P2, particularly in the case of clostridia. The results of the experiment suggest the positive effect of probiotic consumption in the digestive tract of pigs, thereby to reduce of risk for example diarrheal diseases.

Key words: microbial community, probiotics, intestinal microflora

Acknowledgments: This research was supported by grant IGA MENDELU grant no. TP5/2012.

ÚVOD

Střevní mikroflóra prasat tvoří komplex více než 500 různých bakteriálních druhů (Gaskins, Croix *et al.*, 2008). Jednotlivé druhy střevní mikroflóry mají stimulační, nebo naopak potlačující vliv na ostatní druhy v závislosti na věku zvířete, skladbě stravy a míře stresu, kterému jsou hospodářská zvířata často vystavována (Gaggia, Mattarelli, Biavati, 2010). Probiotika podávaná v určených krmných dávkách jsou schopna kolonizovat zvířecí trávicí trakt a zachovávat nebo zvyšovat přirozenou střevní mikroflóru a bránit kolonizaci patogenních mikroorganismů (Maré, 2009; Kaboosi, 2011). Hlavními rody bakterií v trávicího traktu prasete jsou *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* a druh *Escherichia coli* (Metzler, Mosenthin, 2008).

Účinek probiotik je vyšší u mladých zvířat, která ještě nemají zcela vyvinutý stabilní systém mikroflóry, a u zvířat po léčbě antibiotiky, při níž dojde k potlačení střevní mikroflóry (Maré, 2009). Kultury prospěšných mikroorganismů, které zvíře přijme spolu s krmivem, se množí a kolonizují střevo zvířete. Probiotické mikroorganismy nekolonizují střevo natrvalo, ale jen dočasně, proto pro udržení jejich stabilní hladiny by měly být součástí každé krmné dávky (Václavíková, Lustyková, 2011). Probiotika jsou živé mikroorganismy, které se po požití musejí dostat do střeva, aniž by došlo k omezení jejich životaschopnosti (Santos *et al.*, 2010).

Komplexně vzato, probiotika by měla mít svými obecnými vlastnostmi a schopnostmi příznivý vliv například na léčbu střevních zánětů a velké množství studií (Frič, 2005; Liang, 2007) tuto jejich schopnost potvrdilo. Na druhé straně existují i studie (Lata *et al.*, 2007; Zbořil *et al.*, 2005), které jejich jednoznačné příznivé působení neprokázaly. Rozdíly výsledků mohly být způsobeny v důsledku použitím různých probiotických bakterií, zkoumaných skupin zvířat či jiných faktorů. Všichni autoři a odborníci se však shodují v jednom bodě, tato oblast působení je, i když se jí v současnosti věnuje více pozornosti, stále málo probádaná a definitivní výsledky přinesou až další studie a výzkumy.

Předmětem této práce se tedy stalo srovnání účinku dvou různých probiotických krmných směsí na kvantitativní zastoupení vybraných druhů zvířecí střevní mikroflóry, obzvláště druhu *Escherichia coli*.

MATERIÁL A METODIKA

Výzkum byl zaměřen na sledování vlivu probiotických kultur na druh *Escherichia coli* (*E. coli*) vyzolované ze střevním traktu odstavených selat.

K pokusu byla vybrána selata (prasničky) plemene České bílé ušlechtilé v průměrné hmotnosti při naskladnění 25 kg. Selata byla rozdělena do tří skupin po 10 kusech (dvě pokusné skupiny a jedna skupina kontrolní, kde nebylo použito žádné probiotikum). První tři týdny odchovu byly všechny skupiny krmeny identicky. Od 4 týdne dostávaly dvě pokusné skupiny probiotické směsi po dobu 30-ti dní. První pokusná skupina byla krmena minerálním krmivem, které obsahovalo probiotikum *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB10415) a druhá pokusná skupina dostávala krmivo EM-EKO ProBio original se směsí probiotických kultur. Obsah krmné dávky byl u obou pokusných skupin stejný - 1×10^9 KBE/g. V průběhu pokusu byl skupinám 3x odebrán vzorek stolice, a to 0. den (na konci 3. týdne), 15. den (během konzumace) a 30. den (konec konzumace). Exkrementy byly odebírány do sterilních vzorkovnic.

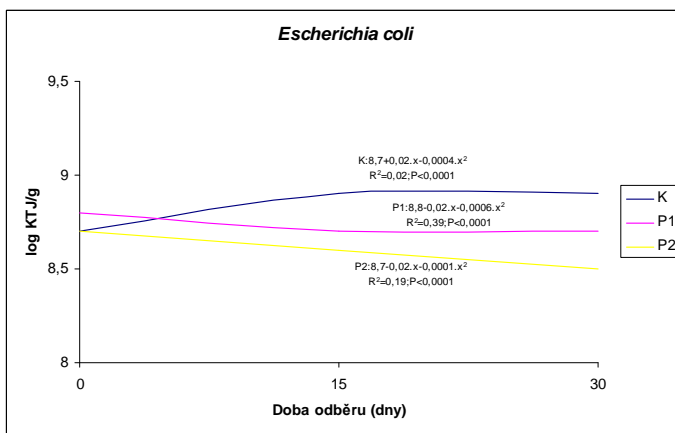
Při rozborech bylo použito pomnožování médium Nutrient Broth Peptone (Himedia, Itálie). Kultivace probíhala plotnovou metodou pomocí roztěru, při níž byly stanovovány tyto skupiny mikroorganismů: bakterie mléčného kvašení (BMK) na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) při 37 °C za 72 h anaerobně. *E. coli* na ENDO agaru (Biokar Diagnostics, Francie) při 37 °C za 72 h aerobně. Rod *Enterococcus faecium* na médiu HICrome *E. faecium* (Himedia, Itálie) při teplotě 37 °C po dobu 48 h aerobně, druh *Lactobacillus acidophilus* na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) s přísádkem suplementu Clindamycin hydrochloride (Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C za 72 h anaerobně, druh *Lactobacillus rhamnosus* na MRS agaru (Biokar Diagnostics, Francie) s přísádkem suplementu vancomycin (Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C za 72 h anaerobně, druh *Lactobacillus casei* na MRS-IM-sorbitol agaru při 37 °C za 72 h anaerobně. Rod *Bifidobacterium* na BSM agaru (Fluka, Švýcarsko) s přísádkem BSM suplementu (Fluka, Švýcarsko) při teplotě 42 °C po dobu 125 h anaerobně, rod *Clostridium* na Bouillon RCM de Hirsch (Biokar Diagnostics, Francie) s přísádkem Bacteriological agar Type E (Biokar Diagnostics, Francie). Po ukončení kultivace byly na jednotlivých Petriho miskách odečteny narostlé kolonie a výsledek vyjádřen v KTJ/g. Vybrané kolonie byly dále vyzolovány a purifikovány na selektivních živných půdách.

Mikrobiologické ukazatele byly měřeny ve dvou opakováních u každého odebraného vzorku. Průměry z těchto dvou měření byly použity ve statistickém vyhodnocení. Program Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) byl použit pro výpočet základních statistických charakteristik a regresi (testování kvadratické funkce), rozdílů mezi skupinami vzorků v počtu mikrobiálních kolonií (jednostupňové třídění analýzy rozptylu, včetně post hoc Duncanova testu).

VÝSLEDKY A DISKUZE

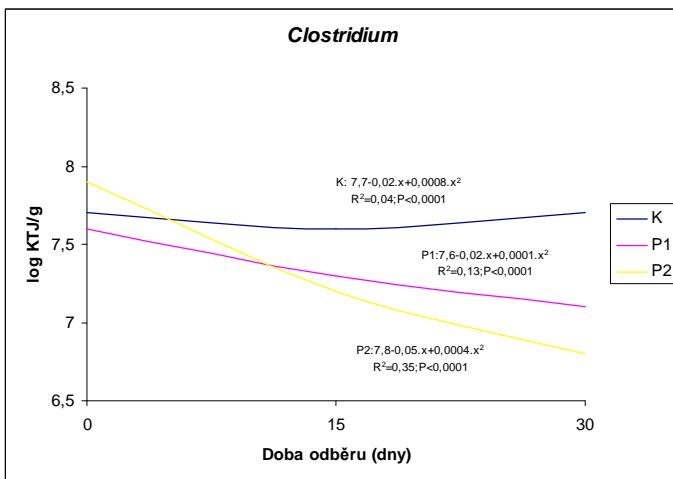
Výsledky stanovení počtů závislosti jednotlivých sledovaných mikroorganismů přítomných ve stolici prasniček kontrolní skupiny (K) a dvou pokusných skupin (P1 a P2) jsou znázorněny na Obr. 1 až 4. Skupiny P1 a P2 byly krmeny odlišnými probiotickými krmivky. Na Obr. 5 jsou zvláště zobrazeny růstové křivky u vybraných bakterií mléčného kvašení u skupiny P2.

Obr. 1 Celkový počet druhu *Escherichia coli* ve vzorcích



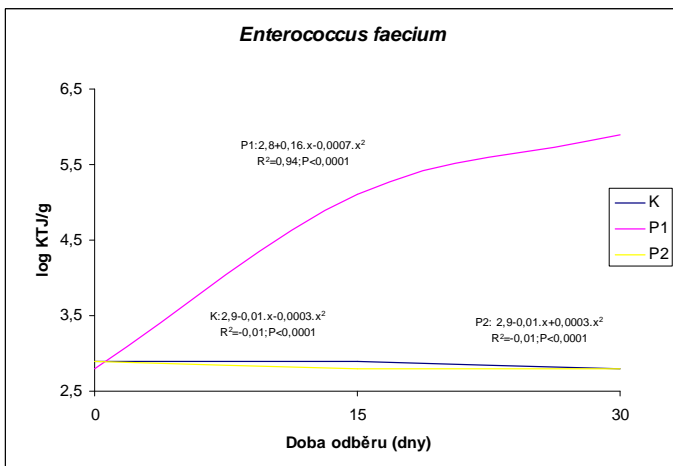
Na Obr.1 jsou znázorněny logaritmické hodnoty z celkového počtu druhu *Escherichia coli* ve vzorcích. Počáteční hodnoty skupin K a P2 začínaly ve stejných počtech těchto bakterií (8,7 log KTJ/g). U skupiny P1 byl zaznamenán v 0. dni nepatrně vyšší počet těchto bakterií (rozdíl pouze o 0,1 log KTJ/g). U obou pokusných skupin (P1,P2) nedošlo k výraznému snížení druhu *E. coli*. Probiotikum *E. faecium* SF 68 používané u skupiny P1 mělo vliv na snížení počtu bakterií pouze do 15.dne, poté zůstala udržena stejná hladina až do konce celého pokusu. Kdežto u skupiny P2 s použitím probiotické směsi tento mírný pokles přetrvával do 30. dne. V kontrolní skupině (K) došlo od 0. do 15. dne k navýšení počtu těchto bakterií o 0,5 log KTJ/g, od 15. dne docházelo k nepatrnému poklesu. Smith *et al.* (2011) zaznamenali již v minulosti účinek probiotické snížení na počet bakterie *E. coli*, avšak nikoli ve střevním traktu prasat, ale s použitím biofilmu in vitro.

Probiotika zamezují přítomnosti a růstu potencionálních patogenů, což se potvrdilo i v naší studii. Mezi možné patogeny řadíme například druhy *Escherichia coli*, rod *Clostridium* a další. Tyto bakterie mohou při vyšším výskytu způsobovat infekce, průjemová onemocnění a jiné zdravotní potíže (Rosenbaum, 2006). V našem pokusu (Obr. 1 a 2) se oproti skupině P1 projevil vyšší inhibiční účinek na tyto bakterie u pokusné skupiny P2, kde byla použita směšná probiotická kultura. Stejný vliv probiotických směsí byl zaznamenán ve studii Gagnona *et al.* (2004).

Obr. 2 Celkový počet rodu *Clostridium* ve vzorcích

Obr. 2 znázorňuje průměr absolutních hodnot vyjádřených v log KTJ/g počtu bakterií *Clostridium* ve střevním traktu prasniček v průběhu celého pokusu. Z těchto hodnot je patrné, že u obou pokusných skupin, tedy P1 (použité probiotikum *Enterococcus faecium* SF 68) a P2 (použita probiocká směs EM-EKO ProBio originál), došlo ke snížení počtu klostridií od počátečního dne pokusu (0. den) až po jeho ukončení (30.den). Výraznější snížení počtu bakterií však bylo zjištěno u skupiny P2, oproti skupině P1. Tento pokles činil rozdíl jednoho logaritmického řádu. U kontrolní skupiny byl zaznamenán mírný pokles klostridií od 0. do 15. dne, avšak od 15. dne začaly počty opět mírně vzrůstat.

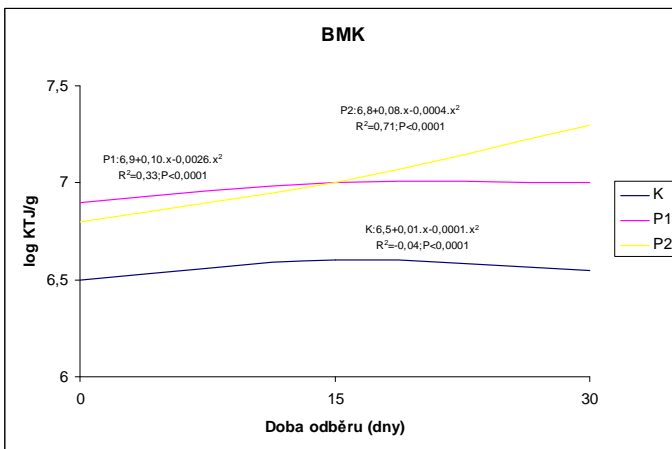
V našem experimentu (Obr. 2) byl zaznamenán inhibiční vliv probiotik na bakterii *Clostridium*, stejný účinek potvrdil i Palaria (2011), avšak v lidském trávicím traktu. Tento inhibiční účinek je pozitivní, jelikož zvýšením počtu klostridií mohou nastat poruchy trávení (průjmy) a další střevní problémy (Berild *et al.*, 2003; Ben-Horin *et al.*, 2009).

Obr. 3 Celkový počet druhu *Enterococcus faecium* ve vzorcích

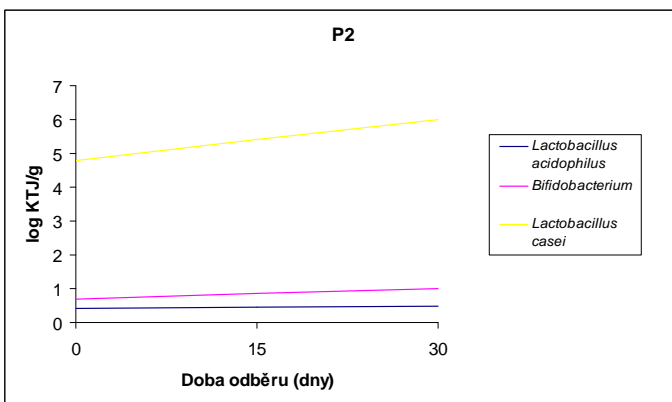
Na Obr. 3 je patrné, že u pokusné skupiny P1, která byla krmena pouze probiotikem *Enterococcus faecium* SF 68 došlo k výraznému nárůstu tohoto druhu bakterií již od 0. do 15. dne (o 2,1 log KTJ/g) a toto zvýšení pokračovalo až do 30. dne, ale jen o 1 log KTJ/g. U skupin K a P2 zůstávaly počty bakterie *Enterococcus faecium* po celou dobu pokusu přibližně ve stejných hodnotách (2,7 log KTJ/g).

Pokusná skupina P1 byla krmena probiotikem *Enterococcus faecium*, což se také pozitivně projevilo jeho zvýšením v průběhu celého pokusu. Zvýšení počtu těchto bakterií bylo také zaznamenáno ve studiích (Taras *et al.*, 2007; Apás *et al.*, 2010), kde byl pozorován pozitivní vliv na různé hostitele (myši, kozy). Nicméně studie účinku probiotika *E. faecium* na patogenní bakterie (*E. coli*, *Clostridium*) na hospodářských zvířatech jsou velmi vzácné (Szabó *et al.*, 2009). U pokusné skupiny P2, kde byla podávána probiotická směs nebyl nárůst pozorován z důvodu použití jiných bakteriálních druhů, než tomu bylo například ve studii Apás *et al.* (2010), kde probiotická směs zaznamenala zvýšení tohoto druhu ve střevním traktu koz.

Obr. 4 Celkový počet bakterií mléčného kvašení ve vzorcích



Obr. 5 Celkový počet *L. acidophilus* a *L. casei* a bifidobakterií ve vzorcích u pokusné skupiny P2



V počtech bakterií mléčného kvašení (Obr. 4) byl patrný rozdíl mezi skupinami K, P1 a skupinou P2, kde byl zaznamenán nárůst o 1 logaritmičkový řád od počátečního až do 30. dne konzumace probiotického krmiva. Autoři Klein *et al.* (2008) zjistili ve stolici probandů průkazně vyšší množství bakterií mléčného kvašení (Obr. 4), zejména druhu *Bifidobacterium lactis* a *L. acidophilus* v reakci na konzumaci 300 g jogurtu obsahující tato probiotika po dobu 5-ti týdnů. Také výsledky autorů Uyeno *et al.* (2008) ukázaly, že v průběhu 20denní konzumace probiotických jogurtů došlo k zvýšení počtu životaschopných laktobacilů ve střevě. Oproti tomu u skupiny K a P1 došlo k mírnému nárůstu počtu těchto bakterií od 0. do 15. dne, poté počty u kontrolní skupiny (K)

začaly mírně klesat. U pokusné skupiny P1 nedošlo od 15. dne k tomuto snížení, početní hladina 15. dne zůstala udržena až do konce konzumace.

Na Obr. 5 jsou znázorněny logaritmické hodnoty z celkového počtu bifidobakterií, druhu *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* u pokusné skupiny P2, která byla krmena probiotickou směsí s obsahem těchto bakterií. Je zde patrné (Obr. 5), že od začátku pokusu byl ve střevní mikroflóře prasniček nejvíce zastoupen druh *Lactobacillus casei* (4,9 log KTJ/g). V průběhu pokusu pak docházelo k mírnému nárůstu u všech pozorovaných bakterií. Mírně vzrůstaly bifidobakterie i druh *Lactobacillus acidophilus*, nejvíce byl však nárůst pozorován u druhu *Lactobacillus casei*. Ve studii Yadav *et al.* (2007) bylo při podávání probiotik také zaznamenáno nejvyššího růstu těchto bakterií, které měli ve střevním traktu prasniček četné zastoupení.

ZÁVĚR

Z tohoto experimentu bylo patrné, že u obou pokusných skupin (P1, P2) konzumujících probiotika docházelo ke snížení celkového počtu potencionálních patogenů druhu *Escherichia coli* i rodu *Clostridium*. U pokusné skupiny P2 byl tento efekt mnohem znatelnější, zvláště v případě klostridií. K navýšení počtu bakterií mléčného kvašení došlo v průběhu celého pokusu u pokusné skupiny P2, u skupiny P1 docházelo k mírnému nárůstu pouze do 15. dne. U pokusné skupiny P2 byly dále zkoumány vybrané bakterie (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei*) na celkové počty ve střevním traktu prasniček. Bylo zjištěno, že během celého pokusu si udržoval nejvyšší zastoupení druh *Lactobacillus casei*.

Výsledky experimentu tedy naznačují pozitivní vliv konzumace probiotických krmných směsí na zažívací trakt prasat, a tím snižování rizika např. vzniku průjemových onemocnění.

LITERATURA

APÁS, A., L. *et al.*, 2010: Probiotic administration effect on fecal mutagenicity and microflora in the goat's gut, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 110, No. 5., 537 – 540

BEN–HORIN, S. *et al.*, 2009: Combination Immunomodulator and Antibiotic Treatment in Patients With Inflammatory Bowel Disease and *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Vol. 7, Issue 9, 981–987

BERILD, D. *et al.*, 2003: *Clostridium difficile* infections related to antibiotic use and infection control facilities in two university hospitálé. *Journal of Hospital Infection*. Vol. 54, Issue 3, 202–206

FRIČ, P., 2005: Probiotika v terapii chorob trávicího ústrojí. *Interní medicína pro praxi*, roč. 7, č. 10, s. 435

GAGNON, M., KHEADR, E. E., BLAY, G., FLISS, I., 2003: In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology* 92, 69 – 78.

GASKINS, H. R., CROIX J. A. *et al.* 2008: Impact of the Intestinal Microbiota on the Development of Mucosal Defense Oxford Journals Medicine ,Clinical Infectious Diseases, Volume 46, Issue Supplement 2, Pp. S80-S86.

KABOOSI, H., 2011: Antibacterial effects of probiotics isolated from yoghurts against some common bacterial pathogens, African Journal of Microbiology Research Vol. 5(25), pp. 4363-4367

KLEIN, A., FRIEDRICH, U., VOGELSANG, H., JAHREIS, G., 2008: *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. European Journal of Clinical Nutrition 62, 584-593.

LATA, J., JURÁNKOVÁ, J., PŘÍBRAMSKÁ, V., 2007: Probiotika v gastroenterologii a hepatologii. Interní medicína pro praxi, 2007, roč. 9, č. 1, s. 8.

LIONG, M., T., 2007: Probiotics: A critical Review of their Potential Role as Antihypertensives, immune Modulators, Hypocholesterolemic, and Premenopausal Treatments. Nutrition Reviews, vol.65, No 7, pg. 320

MARÉ, L., 2009: The use of prebiotics and probiotics in pigs: A review [online]. Agricultural Research Council – Livestock Business Division: Animal Production, Dostupný z WWW: <<http://www.sapork.biz/the-use-of-prebiotics-and-probiotics-in-pigs-a-a-review/>>

METZLER, B. U., MOSENTHIN, R., 2008: A Review of Interactions between Dietary Fiber and the Gastrointestinal Microbiota and Their Consequences on Intestinal Phosphorus Metabolism in Growing Pigs, Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 21, No. 4 : 603 - 615

PALARIA, A. *et al.*, 2011: Effect of a synbiotic yogurt on levels of fecal *Bifidobacteria*, *Clostridia* and *Enterobacteria*. Appl. Environ. Microbiol. Appl Environ Microbiol 2009 May, 75 (9): 2621-2628.

ROSENBAUM, F., 2006: Probiotika. Pharmanews [cit. 20. března 2008]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.pharmanews.cz/2006_03/probiotika.html>

SANTOS, L., M. *et al.* 2010: Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. Med Microbiol Immunol 200, 29–38

SANTOS, L., M. *et al.* 2010: Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. Med Microbiol Immunol 200, 29–38

SMITH, R., A. *et al.*, 2011: Effect of synbiotic on microbial community structure in a continuous culture model of the gastric microbiota in enteral nutrition patients. FEMS Microbiology ecology, 1–11

SZABÓ, I. *et al.*, 2009: Influence of a Probiotic Strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT104 Infection in a Porcine Animal Infection Model, Appl Environ Microbiol.; 75(9): 2621–2628.

TARAS, D. *et al.*, 2007: Probiotics in pigs – modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance, ScienceDirect, Livestock Science 108, 229 – 231 článek

UYENO, Y., SEKIGUCHI, Y., KAMAGATA, Y., 2007: Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. International Journal of Food Microbiology 122, 16–22.

VÁCLAVÍKOVÁ, E., LUSTYKOVÁ, A., 2011: Probiotika ve výživě prasat. Krmivářství č. 5, 15 – 17, ISSN 1212-9992.

YADAV, H., M. *et al.*, 2007: Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats, Nutrition, Volume 23, Issue 1, January 2007, Pages 62–68

ZBOŘIL, V. *et al.*, 2005: Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Praha: Grada, s.15, 86-87, ISBN 80-247-0584-2