

UGOTAVLJANJE ŠTEVILA PROBIOTIČNIH MIKROORGANIZMOV V KRMNIH MEŠANICAH

Rok NOVAK^{a)}, Bojana BOGOVIČ-MATIJAŠIĆ^{b)} in Irena ROGELJ^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-pošta: rok.novak@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Isti naslov kot ^{a)}, dr., e-pošta: bojana.bogovic@bfro.uni-lj.si.

^{c)} Isti naslov kot ^{a)}, prof., dr., e-pošta: irena.rogelj@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 03. septembra 2008, sprejeto 06. decembra 2008.

Received September 03, 2008, accepted December 06, 2008.

IZVLEČEK

V prehrani živali se uporablja širok spekter probiotičnih mikroorganizmov, ki pripadajo mlečnokislinskim bakterijam, kvasovkam ali rodu *Bacillus*. V raziskavi smo ugotavljali število mikroorganizmov oziroma njihovih spor v različnih krmnih mešanicah in premiksah, ki so vsebovali komercialne probiotične pripravke Bioplus 2b, Vebac ali Biosaf. Pri bakterijskih sevih *Bacillus subtilis* in *Bacillus licheniformis*, ki smo ju osamili iz pripravka Bioplus 2b, smo ugotavljali občutljivost za antibiotike, protimikrobno aktivnost ter sposobnost preživetja v simuliranem želodčnem in črevesnem soku. Ugotovili smo, da je bilo v vseh testiranih proizvodih število probiotičnih mikroorganizmov oziroma spor manjše od deklariranega. Razlika med deklariranim in ugotovljenim številom je bila največja pri proizvodih z dodatkom pripravkov Vebac in Biosaf. Izolata *B. subtilis* in *B. licheniformis* sta občutljiva za vse izbrane antibiotike razen metronidazola. Test preživetja je pokazal, da simulirana želodčni oz. črevesni sok nimata večjega vpliva na preživetje spor, vegetativne celice obeh sevov *Bacillus* pa so zelo občutljive za nizke vrednosti pH in žolčne soli. *B. licheniformis* je inhibiral rast predvsem po Gramu pozitivnih bakterij, medtem ko je bil *B. subtilis* učinkovitejši proti po Gramu negativnim bakterijam.

Ključne besede: živinoreja / prehrana živali / krmne mešanice / mikrobiologija / probiotiki / *Bacillus* / antibiotiki / protimikrobna aktivnost

ENUMERATION OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN FEED MIXTURES

ABSTRACT

In animal nutrition a wide range of probiotic microorganisms belonging to lactic acid bacteria, yeasts and *Bacillus* genus are used. In this study we determined the number of microorganisms in different complete feed mixtures and premixtures, containing commercial probiotic supplements Bioplus 2b, Vebac or Biosaf. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* bacterial strains, which were isolated from product Bioplus 2b, were tested for antibiotic susceptibility, antimicrobial activity and ability to survive in simulated gastric and intestinal juice. We found that all tested products contained lower number of microorganisms than declared. The difference between declared and established value was the highest in products with Vebac and Biosaf. *B. subtilis* and *B. licheniformis* isolates were sensitive to all selected antibiotics except metronidazol. Survival test showed that simulated gastric or intestinal juices did not have considerable effect on spore survival, while vegetative cells of *Bacillus* strains were very sensitive to low pH and bile salts. *B. licheniformis* inhibited mostly Gram positive bacteria, while *B. subtilis* was more efficient against Gram negative bacteria.

Key words: animal husbandry / animal nutrition / feed mixtures / microbiology / probiotics / *Bacillus* / antibiotics / antimicrobial activity

UVOD

Probiotiki se v prehrani živali uporabljajo že vrsto let. Zanimanje za njihovo uporabo pa se je s prepovedjo uporabe antibiotikov kot pospeševalcev rasti v Evropski uniji z letom 2006 še povečalo. Probiotični mikroorganizmi predstavljajo v prehrani živali alternativo antibiotikom, saj lahko s svojo prisotnostjo oz. metabolično aktivnostjo uravnavajo mikrobno ravnovesje v prebavilih ter bolj ali manj učinkovito vplivajo na imunski status živali. Praksa je pokazala, da živali z 'zdravo' mikrofloro bolje prirastajo, porabijo manj krme za enoto prirasta in imajo bistveno manj zdravstvenih težav (Ortwin, 2005).

Komercialni probiotični dodatki in krmila morajo v deklaraciji vsebovati informacijo o vrsti mikroorganizma (identifikacijska številka seva) in minimalnem številu kolonijskih enot na gram oz. mililiter proizvoda (Uredba 1831/2003/ES). Analize pogosto pokažejo razkorak med deklarirano in ugotovljeno mikrobno sliko. Največkrat gre za manjše število celic od deklariranega, nemalokrat celo za nepravilno ali pomanjkljivo identifikacijo mikroorganizmov (Green in sod., 1999; Duc in sod., 2004; Hoa in sod., 2000), kar je z vidika varovanja zdravja zelo sporno.

Učinek določenega probiotika, ki ga dodajamo živalim v krmo ali vodo za napajanje, je odvisen predvsem od starosti, zdravstvenega stanja in vrste živali. Znano je, da so učinki probiotikov opaznejši pri mladih in stresu izpostavljenih živalih. Nerazvita prebavna mikroflora ali pa porušeno ravnovesje le-te (disbioza) največkrat vodita v slabšo telesno kondicijo, zahiranost in razne prebavne težave, npr. driske, ki jih povzročajo bakterijski toksini. Probiotiki s svojo prisotnostjo in/ali aktivnostjo vzdržujejo mikrobno ravnovesje prebavil (evbiozo), tako da zavrejo oz. preprečijo razrast neželenih mikroorganizmov (De Vrese in Marteau, 2007).

Eden pomembnejših aspektov uporabe probiotikov v živalski prehrani je njihova uporabnost oziroma primerne tehnološke lastnosti. Mikroorganizmi, ki jih dodajamo krmilom, morajo preživeti bolj ali manj agresivne tehnološke procese, kot so peletiranje, mešanje, briketiranje ali ekspaniranje. Zelo pomembno je, da ohranijo viabilnost tudi med daljšim skladiščenjem. Mikroorganizme lahko v ta namen zaščitijo s posebnimi postopki kot sta enkapsulacija ali 'coating', kjer žive celice obdajo z zaščitnimi plastmi, sestavljenimi iz mikrogranul, odmrlih celic ali drugih snovi. Tako lažje preživijo visoko temperaturo in pritisk, ki nastajata pri omenjenih postopkih (Ortwin, 2005).

V prehrani živali se uporabljajo različni probiotični mikroorganizmi, med katerimi prevladujejo bakterijske vrste iz rodov *Enterococcus* (*E.*) ali *Bacillus* (*B.*) ter kvasovke *Saccharomyces* (*S.*). Posebej zanimivi so mikroorganizmi iz rodu *Bacillus*, ki sicer niso nativni prebivalci prebavil, ampak bolj prehodni. Kot probiotiki so zanimivi predvsem zato, ker tvorijo endospore, ki so odporne proti različnim ekstremnim okoljskim razmeram (temperatura, pH, encimi, kemikalije, radiacija). Spore rodu *Bacillus* brez večjih izgub preživijo proizvodne procese in prehod preko prebavil do debelega črevesa, kjer lahko učinkujejo (Spinosa in sod., 2000). Zaradi svoje prehodne narave imajo velik potencial lokalnega stimuliranja imunskega sistema prebavil, o čemer poroča vse več študij (Sanders in sod., 2003; Duc in sod., 2004a; Midilli in sod., 2008).

Namen naše raziskave je bil ovrednotiti število probiotičnih mikroorganizmov v krmilih, ki so bila izdelana z različnimi postopki. Pri dveh probiotičnih mikroorganizmih iz rodu *Bacillus*, ki smo ju osamili iz produkta Bioplus 2b, smo preučili še sposobnost preživetja skozi želodec in tanko črevo, občutljivost za antibiotike in protimikrobne aktivnosti. Omenjene lastnosti so namreč za probiotike posebej pomembne.

MATERIAL IN METODE

Material

Obravnavali smo 16 vzorcev krmil za živali slovenskega proizvajalca, od tega 14 dopolnilnih oziroma vitaminsko-mineralnih mešanic in dve popolni krmni mešanici. Vzorci so bili stari največ tri dni. Razen po obliki, t. j. peletirani, drobljeni oziroma prašnati, so se razlikovali po probiotičnem dodatku. Osem vzorcev je vsebovalo pripravek Bioplus 2b (Christian Hansen, Danska), pet vzorcev Vebac (Medipharm AB, Švedska), trije vzorci pa Biosaf (S.I. Lesafre, Francija). Vsebovani mikroorganizmi in deklarirano število so podani v pregl. 1.

Preglednica 1. Vrste in oznake sevov probiotičnih mikroorganizmov v komercialnih probiotičnih pripravkih ter deklarirano število

Table 1. Species and strain designation of probiotic microorganisms in commercial probiotic supplements and declared number

Ime probiotičnega pripravka Name of probiotic supplement	Vrsta in oznaka seva Species and strain designation	Število v g, KE/g Number per g, CFU/g
Bioplus 2b	<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 5750) ^a	$1,6 \times 10^9$
	<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 5749) ^a	$1,6 \times 10^9$
Vebac	<i>Enterococcus faecium</i> M74 (NCIMB 11181)	$5,0 \times 10^{10}$
Biosaf	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NCYC sc 47)	$5,0 \times 10^9$

^a spore/ spores; KE, kolonijske enote; CFU, colony forming units

Metode

Ugotavljanje števila mikroorganizmov

Za ugotavljanje števila mikroorganizmov v krmnih mešanica smo uporabili validirane metode, kot jih navajajo Leuschner in sod. (2002, 2003, 2003a). Vzorce smo homogenizirali v 0,2 % raztopini NaOH oziroma fosfatnem pufri, decimalne redčitve pa smo izvedli v peptonski vodi (pepton 1g/l, NaCl 8,5 g/l, Tween 80 0,01 %, pH 7,0 ± 0,2). Raztopine vzorcev, ki so vsebovali spore bacilov, smo temperirali v vodni kopeli 10 minut pri 80 °C, s čemer smo uničili vegetativne celice in spodbudili germinacijo spor. Za spore *Bacillus* smo uporabili gojišče TSA (triptic soy agar) (Biolife, Italija), za enterokoke BEA (bile esculin azid) in za kvasovke CGYE (chloramphenicol glucose yeast extract). Vzorce z dodatkom pripravka Bioplus 2b smo inkubirali 24 ur pri 30 °C. To modifikacijo smo izvedli zato, ker so bile kolonije *B. subtilis* in *B. licheniformis* po 16 urni inkubaciji pri temperaturi 37 °C tako velike, da je to oteževalo štetje. Enterokoke smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, kvasovke pa 48 ur pri 35 °C.

Ugotavljanje občutljivosti za antibiotike

Pri mikroorganizmih *B. subtilis* in *B. licheniformis*, ki smo ju osamili iz preparata Bioplus 2b, smo testirali občutljivost za deset izbranih antibiotikov s pomočjo sistema E-test (AB Biodisk, Švedska). Upoštevali smo navodila proizvajalca. Celice iz 16-urne kulture inkubirane v gojišču BHI (Merck, Nemčija) pri 30 °C, smo centrifugirali (3500 g, 10 min), sprali z ¼ Ringerjevo raztopino ter resuspendirali v primerni količini iste raztopine, tako da je bila optična gostota pri valovni dolžini 625 nm med 0,04 in 0,05, kar je ustrezalo koncentraciji 10^7 celic/ml. Po 100 µl suspenzije smo razmazali na petrijeve plošče z agarjem Mueller-Hinton (Merck, Nemčija),

pustili, da se inokulum vpije in površina nekoliko osuši, nato pa nanesti trakove z antibiotiki. Plošče smo inkubirali pri 30 °C, 20 do 24 ur, ter odčitali minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) (µg/ml) posameznih antibiotikov.

Ugotavljanje občutljivosti za prebavne sokove

Celice *B. subtilis* in *B. licheniformis* iz 18-urne kulture smo izpostavili simuliranemu okolju, kakršno vlada v prebavilih. V ta namen smo pripravili simuliran želodčni sok in simuliran sok zgornjega tankega črevesa (Barbosa in sod., 2005). Za prvega smo izotoničnemu pufru z Bott-Wilson-ovimi solmi (1,24 % K₂HPO₄, 0,76 % KH₂PO₄, 0,1 % trinatrijev citrat, 0,6 % [NH₄]₂SO₄, pH = 6,7) dodali 0,85 % NaCl in 1 mg/ml pepsina (Sigma, Nemčija) in s HCl umerili vrednost pH na 2. Za simuliran sok tankega črevesa pa smo v izotoničnem pufru raztopili 0,2 % žolčnih soli št.3 (Biolife, Italija) in dodali pankreatin (mešanica pankreasnih encimov) (Sigma, Nemčija). Testirali smo občutljivost spor kot tudi vegetativnih celic obeh organizmov.

Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti

Protimikrobno aktivnost *B. subtilis* in *B. licheniformis* smo ocenili z metodo, ki so jo opisali Barbosa in sod. (2005). Točkasto inokulirani kulturi testiranih sevov bacilov, ki so rasli 16 ur na ploščah z Luria-Bertani agarjem, smo izpostavili kloroformnim hlapom za 30 do 60 minut. Plošče smo prepihali z zrakom (20 min) v laminariju in prelili s 5 ml poltrdih gojišč (7,5 g/l agar-agarja) MRS (Merck, Nemčija), BHI (Merck, Nemčija) oziroma RCM (Merck, Nemčija). Ta so bila inokulirana s 50 µl različnih indikatorskih kultur, ki smo jih gojili aerobno 24 ur pri 37 °C. Pri isti temperaturi smo gojili tudi *C. prefringens* vendar v anaerobnih pogojih, 48 ur. Indikatorske kulture so izvirale iz zbirke American type culture collection (ATCC), National collection of dairy organisms (NCDO), Deutsche sammlung von microorganismen (DSM) in zbirke mikroorganizmov Inštituta za mlekarstvo, Biotehniške fakultete (IM). Velikost con inhibicije smo izmerili po 20 do 24 urah inkubacije pri 37 °C oziroma 30 °C (za *Lb. sakei*).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Definicija o probiotikih pravi, da moramo za dosego pozitivnih oz. zelenih učinkov le-te zaužiti v zadostni količini (Guarner in Schaafsma, 1998). Vrsta študij na živalih je pokazala, da premajhne količine dodanih probiotikov nimajo učinka ne na prirast, ne na imunski odziv živali, na drugi strani pa tudi presežne količine nimajo nič večjega učinka kot priporočljive (Jin in sod., 1998; Pelicano in sod., 2003; Abdollahi in sod., 2002; Chumpawadee in sod., 2008). Proizvajalci morajo upoštevati izgube živosti mikroorganizmov, ki nastajajo v proizvodnji krmil, sicer v končnem proizvodu ni dovolj živih probiotikov.

V pregl. 2 je prikazano število mikroorganizmov v krmnih mešanicah, ki smo ga ugotovili s štetjem na ploščah in deklarirano število probiotikov, ki smo ga izračunali iz deleža dodanega probiotičnega pripravka.

Vsi vzorci krmil so vsebovali manj probiotičnih mikroorganizmov, kot je deklariral proizvajalec. Razlike med ugotovljenim in deklariranim številom variirajo od 20 do 100 %. Največje izgube smo ugotovili pri proizvodih, ki so vsebovali preparata Vebac in Biosaf, kar ni presenetljivo, saj vsebujeta žive celice *E. faecium* oziroma *S. cerevisiae*. V štirih vzorcih od petih z dodanim *E. faecium* so bile razlike med ugotovljenimi in deklariranimi vrednosti za več kot 96 %. Proizvod Vebac sicer vsebuje enkapsulirane enterokoke, ki po zagotovilih proizvajalca preživijo temperature do 65 °C, zato tako velikih izgub med tehnološkim postopkom ni bilo pričakovati, sploh ker omenjeni izdelki niso bili peletirani.

Preglednica 2. Število (log KE/g) probiotičnih mikroorganizmov v krmnih mešanicah, ugotovljeno s štetjem na ploščah, ter primerjava z deklariranim številom (log KE/g)

Table 2. The number (log CFU/g) of probiotic microorganisms in feed mixtures determined by plate counting and comparison with the number labeled (log CFU/g)

Vzorec	% dodanega probiotika	Deklarirano št., log KE/g	Ugotovljeno št., log KE/g	Izguba, % ^a
Mešanice s pripravkom Bioplus 2b				
1 ^b	0,07	6,35	6,12	41,7
2 ^p	0,04	6,11	5,75	55,6
3 ^d	0,03	5,98	5,86	24,9
4 ^p	0,06	6,28	6,19	19,8
5 ^p	0,06	6,28	6,18	20,8
6 ^b	10,00	8,51	7,92	74,0
7 ^b	8,00	8,41	7,83	73,7
8 ^b	8,00	8,41	5,65	99,8
Mešanice s pripravkom Vebac				
9 ^b	0,05	7,40	5,79	97,5
10 ^b	0,05	7,40	5,40	99,0
11 ^b	0,002	6,00	4,64	95,6
12 ^b	0,002	6,00	5,40	75,0
13 ^b	0,004	6,30	4,83	96,6
Mešanice s pripravkom Biosaf				
14 ^d	0,8	7,90	5,73	99,3
15 ^b	0,8	7,90	7,04	86,4
16 ^p	0,07	6,85	6,11	81,7

^a Izguba = (deklarirano št. (KE/g) – ugotovljeno št.(KE/g))/deklarirano (KE/g)*100; ^b prah / powder; ^p peleti / pellets; ^d drobljenec / crum

Vzorci 2 do 5, 14 in 16 so šli skozi proces peletiranja, ki pa ni presegel temperature 80 °C. Izgube živih celic pri vzorcih 14 in 16, ki so vsebovali *S. cerevisiae*, so bile od 82 do 99 %, čeprav naj bi kvasovke po zagotovilih proizvajalca v celoti preživele peletiranje do 83 °C. Za spore mikroorganizmov *B. subtilis* in *B. licheniformis*, iz produkta Bioplus 2b proizvajalec prav tako zagotavlja 100 % preživetje peletiranja. Rezultati naše študije so pokazali za 20 do 56 % premalo živih probiotičnih mikroorganizmov. Domnevamo, da je visoka temperatura (60 do 80 °C) aktivirala del spor, da so germinirale. Germinacija je relativno hiter proces (Levinson in Mildred, 1970), tako je mogoče, da je visoka temperatura poškodovala tudi že del populacije germiniranih spor. Raziskav, ki bi obravnavale vpliv peletiranja na preživetje probiotikov, nismo zasledili. V objavah, ki obravnavajo učinke probiotikov na živalih, pa pogosto navajajo zgolj število mikroorganizmov, ki je dodano krmni mešanici pred procesom peletiranja. Naši rezultati kažejo, da izgub pri peletiranju vendarle ne velja spregledati, saj so precejšnje.

Pri mešanicah z Bioplus 2b, je zanimiva ugotovitev, da smo v izdelkih, ki so bili podvrženi zgolj mešanju sestavin (vzorci 6-8), zabeležili celo večje izgube kot v peletiranih (vzorci 2-5). Vzorci 6-8 so bili odvzeti iz treh premiksov, katerih priprava je nekoliko drugačna od priprave dopolnilnih krmnih mešanic. Mešanje v proizvodnji premiksov je namreč izredno počasno in dolgotrajno. Pri tem nastajajo precej velike tlačne obremenitve na sestavine, od katerih je mnogo

soli v obliki kristalov. Kombinacija kristalov in velikega tlaka v mešalnem stroju bi lahko povzročila poškodbe vegetativnih celic in tudi spor. Literarnih podatkov, ki bi potrdili te domneve, sicer nismo zasledili. Druga možna razlaga za izgubo viabilnosti probiotičnih mikroorganizmov v določenih krmilih pa je lahko tudi prisotnost posameznih sestavin (soli, minerali, kisline), ki so živim mikroorganizmom škodljive ali celo letalne. Tudi nekateri terapevtiki, ki se dodajajo v krmo (npr. kokcidiostatiki), imajo lahko vpliv na mikroorganizme, zato pri probiotičnih mikroorganizmih, ki se uporabljajo v prehrani pitovne perutnine, vedno ugotavljajo tudi občutljivost za izbrani kokcidiostatik (EFSA opinion, 2007).

Natančne analize prisotnosti genov za odpornost proti antibiotikom in zunajkromosomskih elementov (plazmidi in transpozoni) bi morale biti opravljene pri vsakem probiotičnem mikroorganizmu preden pride na tržišče. Evropska komisija za zdravje se pri tej problematiki opira na mnenji strokovega odbora za prehrano živali (SCAN) iz leta 2003 in odbora FEEDAP iz leta 2005, da mikroorganizmov (sevov), ki bi utegnili prenašati pridobljeno odpornost proti določenemu antibiotiku, ne smemo uporabljati v prehrani živali. Zato je bilo s tržišča v zadnjem času umaknjenih kar nekaj probiotičnih preparatov tako za animalno kot humano prehrano (Hong in sod., 2004; Cartman in sod., 2007). Poročilo odbora SCAN (2000) zagotavlja, da *B. subtilis* in *B. licheniformis* ne vsebujeta plazmidov, sta pa odporna proti flavomicinu in cink-bacitracinu, slednji pa tudi proti klindamicinu. Odpornost proti bacitracinu se dokazano ne prenaša niti *in vitro* niti *in vivo*.

B. subtilis DSM 5749 in *B. licheniformis* DSM 5750 sta občutljiva za vse testirane antibiotike (pregl. 1), razen za metronidazol, katerega MIC je večja od 256 µg/ml. V literaturi nismo zasledili podatka o mejni MIC za metronidazol, zato ne moremo zaključiti, ali sta testirana seva odporna proti temu antibiotiku. So pa za *B. licheniformis* Handal in sod. (2003) prav tako zabeležili MIC večjo od 256 µg/ml. *B. licheniformis* je v naši študiji pokazal občutljivost tudi za klindamicin, saj je bila MIC (1,5 oz. 2 µg/ml) nižja od mejne vrednosti MIC za odpornost, kot jih navajajo v mnenju FEEDAP (2005). Kar zadeva odpornost proti kloramfenikolu, pa smo pri *B. licheniformis* ugotovili mejno vrednost, to je 8 µg/ml.

Preglednica 3. Minimalne inhibitorne koncentracije (µg/ml) izbranih antibiotikov za *B. subtilis* in *B. licheniformis*, osamljenih iz izdelka Bioplus 2b

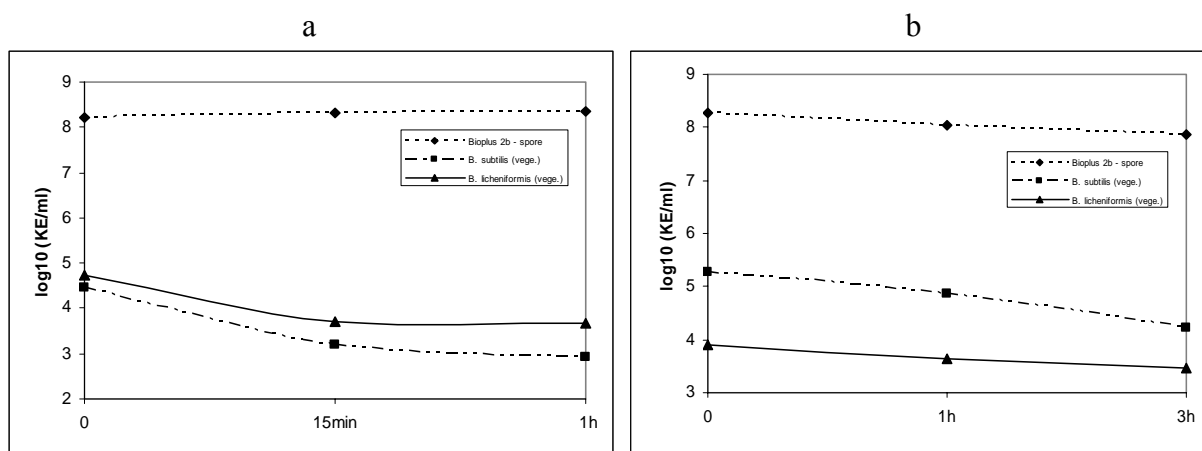
Table 3. Minimal inhibitory concentrations (µg/ml) of selected antibiotics for *B. subtilis* and *B. licheniformis* isolated from Bioplus 2b product

Antibiotik Antibiotic	MIC, µg/ml					
	<i>B. subtilis</i> DSM 5749		<i>B. licheniformis</i> DSM 5750		Meje za rezistenco (breakpoint MIC)	
	Vzorec 1 Sample 1	Vzorec 2 Sample 2	Vzorec 1 Sample 1	Vzorec 2 Sample 2	FEEDAP	SCAN
Streptomycin	6	4	4	4	8	64
Gentamycin	0,38	0,38	0,25	0,25	4	8
Tetracycline	0,19	0,19	0,75	1	8	16
Ampicillin	0,023	0,023	0,5	0,5	nd	2
Metronidazol	> 256	> 256	> 256	> 256	nd	nd
Clindamycin	0,38	0,5	1,5	2	4	nd
Chloramphenicol	1,5	1,5	8	8	8	16
Erythromycin	0,32	0,32	2	3	4	4
Rifampicin	0,23	nd	0,64	0,94	nd	4
Vancomycin	0,38	0,38	0,25	0,25	4	4

FEEDAP opinion (2005); SCAN opinion (2003); nd = ni podatka / no data

Prehod skozi želodec in tanko črevo je za probiotične mikroorganizme ključnega pomena. Glavne ovire na tej poti so nizka vrednost pH v želodcu in proteolitični encim pepsin, v duodenumu tankega črevesa pa produkti žolča (žolčne soli) in encimi trebušne slinavke (lipaze, proteaze in amilaze). Preživetje *B. subtilis* in *B. licheniformis* v simuliranem želodčnem in črevesnem soku prikazuje slika 1. Testirali smo občutljivost spor in vegetativnih celic za nizke vrednosti pH in pepsin v želodcu ter za žolčne soli in pankreatin v začetnem delu tankega črevesa. Spore obeh mikroorganizmov so bile odporne proti nizkemu pH in encimu pepsinu, kakor tudi proti žolčnim solem in encimom trebušne slinavke. Upad števila spor v primeru simuliranega soka tankega črevesa je verjetno posledica germinacije dela spor, ki so jo izzvale žolčne soli. Podobno opažanje so navedli Duc in sod. (2004) v primeru dveh sevov *B. cereus*. Tako imenovan aktivacijski šok lahko povzročijo tudi drugi dejavniki, npr. temperatura in vrednost pH. Spore takrat germinirajo, ker pa je v okolju še vedno prisoten agresiven dejavnik (kislina, žolčne soli, visoka temperatura), vegetativne celice odmrejo, kar se kasneje pokaže v manjšem številu spor (Duc in sod., 2004).

Občutljivost vegetativnih celic se lepo odraža na slikah 1 a in 1 b, kjer je mogoče opaziti drastičen upad števila celic takoj, ko so le te prišle v stik s kislino oz. žolčnimi solmi. Začetno število celic je bilo pri *B. subtilis* $1,31 \times 10^7$ KE/ml, pri *B. licheniformis* pa $9,79 \times 10^6$ KE/ml, kar pomeni za več kot 99 % manjše število KE v simuliranem želodčnem soku in za 99 % oziroma za 100 % manjše število v simuliranem soku tankega črevesa takoj po izpostavitvi kislini oziroma žolčnim solem. O podobnih (> 98 %) izgubah so poročali tudi Barbosa in sod. (2005). Spinosa in sod. (2000) so ugotovili zelo nizke inhibitorne koncentracije konjugiranih in nekonjugiranih žolčnih soli za *B. subtilis*, in sicer 195 in 78 $\mu\text{g/ml}$. Nadaljnje padanje števila vegetativnih celic (po 15min, 1h in 3h) pa je verjetno posledica različnih razvojnih faz obeh mikroorganizmov.



Slika 1. Test preživetja spor in vegetativnih celic mikroorganizmov *B. subtilis* in *B. licheniformis* v simuliranem želodčnem soku (a) in soku zgornjega tankega črevesa (b).
Figure 1. Survival test of spores and vegetative cells of *B. subtilis* and *B. licheniformis* in simulated gastric's (a) and upper small intestine's juices (b).

Produkcija protimikrobnih substanc je eden od pomembnejših zaželenih mehanizmov delovanja probiotičnih mikroorganizmov. Predstavniki rodu *Bacillus* so znani po produkciji različnih protimikrobnih snovi, med katerimi najdemo tako bakteriocine in baktericinom podobne inhibitorne snovi (subtilin, koagulin), kot tudi antibiotike (bacitracin, polimiksin, difcidin, idr.) (Hong in sod., 2005). Produkcija teh snovi in encimov poteka le v celicah v vegetativni obliki, ne pa v sporah. V pregl. 4 je prikazana protimikrobna aktivnost dveh izolatov *Bacillus* proti različnim po Gramu negativnim in po Gramu pozitivnim mikroorganizmom. *B.*

subtilis je zaviral rast predvsem po Gramu negativnih bakterij, najbolj zaviralno pa je deloval proti trem sevom *E. coli*. O močni inhibiciji različnih sevov *E. coli* s strani *B. subtilis* MA139 in *B. subtilis* PY79 so poročali tudi Guo s sod. (2006) in La Ragione s sod. (2001). Nekoliko manjši inhibitorni vpliv je imel *B. subtilis* tudi proti *S. typhimurium*, ki je prav tako kot testirane *E. coli*, pogosta povzročiteljica drisk pri živalih. Proti nekaterim drugim po Gramu pozitivnim mikroorganizmom je *B. subtilis* pokazal manj izrazito inhibicijo, saj cone inhibicije niso bile večje od 2 mm, pri nekaterih ponovitvah testov pa se sploh niso pokazale. Omenjeno variabilnost lahko pripišemo manjšim razlikam v fiziološkem stanju testiranih kultur oziroma v pogojih izvedbe testov (starost gojišč, pogoji med inkubacijo...). *B. licheniformis* na drugi strani pa je zaviral rast zgolj po Gramu pozitivnih bakterij, med njimi večino laktobacilov, ki so bili osamljeni iz prebavil prašiča, kar ne govori v prid uporabi tega probiotičnega pripravka. Nasprotno pa je zelo ugodno, da *B. licheniformis* inhibira rast prašičjega izolata *C. perfringens*, ki pripada vrsti, ki lahko povzroča hude driske in s tem velike izgube pri brojlerjih in novorojenih pujskih (Van Immerseel in sod., 2004; Czanderlova in sod., 2006).

Preglednica 4. Protimikrobna aktivnost *B. subtilis* in *B. licheniformis*
Table 4. Antimicrobial activity of *B. subtilis* and *B. licheniformis*

	Cone inhibicije / inhibitory zone, mm ± std	
	<i>B. subtilis</i> DSM 5749	<i>B. licheniformis</i> DSM 5750
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	3,0 ± 0,0	/
<i>Escherichia coli</i> O8 K88+ Ent+ (IM 263)	5,6 ± 0,6	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,3 ± 0,6	/
<i>Escherichia coli</i> O8 K88+ Ent- (IM 262)	11,0 ± 1,0	/
<i>Clostridium perfringens</i> 2P 119 (IM 71)	/	9,5 ± 0,7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	/	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	+/-	2,5 ± 0,7
<i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714	+/-	10,0 ± 0,0
<i>Lactobacillus reuteri</i> 12/26 (IM 300)	+/-	5,0 ± 0,0
<i>Lactobacillus vaginalis/reuteri</i> 13/26 (IM 302)	+/-	2,5 ± 0,7
<i>Lactobacillus reuteri</i> 10/26 (IM 301)	/	3,0 ± 0,0
<i>Lactobacillus reuteri</i> 9/26 (IM 278)	/	1,5 ± 0,7
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 5749	1,0 ± 0,0 *	2,0 ± 0,0

+/- = variabilni rezultati/variable results; / = ni inhibicije / no inhibition; * = avtokompeticija / autocompetition

SKLEPI

Vsi vzorci krmil, ki smo jih preiskali, so vsebovali manjše število probiotičnih mikroorganizmov, kot je deklariral proizvajalec. Večja odstopanja smo odkrili pri proizvodih, ki so vsebovali preparata Vebac in Biosaf, saj le ta vsebujeta žive mikroorganizme vrst *E. faecium* in *S. cerevisiae*. Presenetile so nas izgube viabilnosti spor v proizvodih s preparatom Bioplus 2b, saj bi v splošnem spore morale dobro preživeti neugodne razmere, tudi takšne, ki vladajo med proizvodnim procesom. Seva *B. subtilis* in *B. licheniformis*, osamljena iz probiotičnega pripravka Bioplus 2b, sta občutljiva za vse testirane antibiotike, razen za metronidazol. Oba brez težav preživita prehod skozi želodec in tanko črevo v obliki spor, vegetativne celice pa so popolnoma neodporne proti nizkim vrednostim pH in žolčnim solem. Njuna protimikrobna aktivnost je

komplementarna, saj *B. subtilis* zavira predvsem po Gramu negativne, *B. licheniformis* pa po Gramu pozitivne bakterije .

SUMMARY

Probiotics are live microbial feed supplements that can benefit the host by improving its intestinal balance (Fuller, 1989) if ingested in adequate concentration (Guarner and Schaffsma, 1998). They are considered as alternatives to antibiotics in animal feed used as growth promoters for farm animals. Their prime mode of action is modification of the microbial population by different mechanisms, such as stimulation of immune response, inhibition of pathogens by aggregation with pathogenic bacteria, by competitive adhesion to epithelial receptors, by production of specific substances (organic acids, bacteriocins, antibiotics) or by competition for nutrients. In order to achieve these effects, the probiotic strains must reach the intestine in a viable form and in sufficient number. This requires the survival of probiotics during feed processing, including pelleting by heat, during feed storage over weeks and finally during the passage through the stomach with adverse low pH condition and through the small intestine with high bile salts concentrations (Ortwin, 2005). The objective of the present work was to determine the number of viable probiotics in 16 different complete feed mixtures and premixtures, containing one of three commercial probiotic supplements, and to estimate the effect of feed processing on microbial survival rate. In addition, some probiotic characteristics of two *Bacillus* strains isolated from a commercial probiotic supplement were determined.

Eight samples of 16 tested contained product Bioplus 2b (Chr. Hansen, Denmark) with spores of two *Bacillus* strains, five samples contained product Vebac (Medipharm AB, Sweden) with *Enterococcus faecium* strain, and three samples contained probiotic supplement Biosaf (S.I. Lesaffre, France) with *Saccharomyces cerevisiae* strain. To our surprise a significant deviation from declared concentrations of viable probiotics was observed in all samples. The biggest losses occurred in samples that contained products Vebac and Biosaf. Although *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae* are present in two above mentioned products in a form protected by encapsulation and coating, they experienced 80 to 100% losses. Naturally resistant endospores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* present in Bioplus 2b, also showed sensitivity to processes such as pelleting and mixing. The losses that occurred in the samples of pelleted feeds were surprisingly lower (20 to 55%) than the losses in premixed samples which underwent mixing only.

Bacillus subtilis DSM 5749 and *Bacillus licheniformis* DSM 5750 isolates from product Bioplus 2b were subjected to some common tests for probiotic microorganisms. We prepared simulated gastric and small intestine juices and observed the survival rate of spores and vegetative cells of both strains. The tests showed that spores survived the exposure to low pH conditions (pH=2) as well as the presence of bile salts in concentrations similar to those in small intestine, without any loss. Nevertheless, a small part of spores which probably germinated, were lethally damaged by the bile salts during the incubation. On the contrary, vegetative cells were extremely sensitive to both low pH and bile salts and were killed almost immediately after exposure. Test for sensitivity to antibiotics showed that both *B. subtilis* and *B. licheniformis* were sensitive to almost all tested antibiotics, except to metronidazol. Most of *B. licheniformis* strains are, according to SCAN (2000) opinion, resistant to clindamycin, however the results of the presented tests showed sensitivity to this antibiotic. *B. subtilis* inhibited various *E. coli* and *S. typhimurium*. Some representatives of the latter two species can cause severe diarrhoea in weanling pigs. The inhibition of most of the other Gram positive microorganisms was weaker, sometimes even non-detectable. *Bacillus licheniformis* inhibited mostly the representatives of Gram positive bacteria, among which the inhibition of *C. perfringens* is of particular importance,

since this species is one of the major diarrhoea causative species in animals. The inhibitory spectra of both *Bacillus* isolates are interesting especially because they are complementary.

"... even when probiotics seem to work ... we know too little about the normal gut ecosystem to understand why", (Abbott, 2004).

VIRI

- Abbott, A. Gut reaction. *Nature*, 427(2004), 284–286.
- Abdollahi, M.R./ Kamyab, A./ Bazzazzadekan, A./ Shahneh, A.Z. Effect of different levels of probiotic (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on broilers performance. *Poultry Science*, 81(2002)1, 134.
- Barbosa, T.M./ Serra, C.R./ La Ragione, R.M./ Woodward, M.J./ Henriques, A.O. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 2(2005)71, 968–978.
- Chumpawadee, S./ Chinrasri, O./ Somchan, T./ Ngamulan, S./ Soychuta, S. Effect of dietary inclusion of cassava yeast as probiotic source on growth performance, small intestine (ileum) morphology and carcass characteristic in broilers. *International journal of poultry science*, 7(2008)3, 246–250.
- Czanderlova, L./ Hlozek, P./ Chmelar, D./ Lany, P. Clostridium perfringens in suckling piglets with diarrhoea and its PCR typing and prevalence in the Czech republic in 2001–2003. *Veterinarni medicina*, 51(2006), 461–467.
- De Vrese, M./ Marteau, P.R. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *The journal of nutrition*, 137(2007), 803–811.
- Duc, L.H./ Hong, H.A./ Barbosa, T.M./ Henriques, A.O./ Cutting, S.M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and environmental microbiology*, 4(2004)70, 2161–2171.
- Duc, L.H./ Hong, H.A./ Uyen, N.Q./ Cutting, S.M. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine*, 22(2004a), 1873–1885.
- Fuller, R. Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 66(1989), 365–378.
- Guarner, F./ Schaffsma, G.J. Probiotics. *International journal of food microbiology*, 39(1998), 237–238.
- Guo, X./ Li, D./ Lu, W./ Piao, X./ Chen, X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(2006), 139–146.
- Handal, T./ Caugant, D.A./ Olsen, I. Antibiotic resistance in bacteria isolated from subgingival plaque in a Norwegian population with refractory marginal periodontitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(2003)4, 1443–1446.
- Hoa, N.T./ Baccigalupi, L./ Huxham, A./ Smertenko, A./ Van, P.H./ Ammendola, S./ Ricca, E./ Cutting, S.M. Characterisation of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and environmental microbiology*, 66(2000)12, 5241–5247.
- Hong, H.A./ Duc, L.H./ Cutting, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2005), 813–853.
- Jin, L.Z./ Ho, Y.W./ Abdullah, N./ Jalaludin, S. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry science*, 77(1998), 1259–1265.
- La Ragione, R.M./ Casula, G./ Cutting, S.M./ Woodward, M.J. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. *Veterinary Microbiology*, 79(2001), 133–142.
- Leuschner, R.G.K./ Bew, J. Enumeration of probiotic bacilli spores in animal feed: Interlaboratory study. *Journal of AOAC int.*, 3(2003)86, 568–575.
- Leuschner, R.G.K./ Bew, J./ Bertin, G. Validation of an official control method for enumeration of authorised probiotic yeast in animal feed. *Systematic and applied microbiology*, 26(2003a), 147–153.
- Leuschner, R.K.G./ Bew, J./ Domig, K.J./ Kneifel, W. A collaborative study of a method for enumeration of probiotic enterococci in animal feed. *Journal of applied microbiology*, 93(2002), 781–786.
- Levinson, H.S./ Mildred, H.T. Activation energy for glucose-induced germination of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of bacteriology*, 1970, 270–271.
- Midilli, M./ Alp, M./ Kocabagh, N./ Muglah, H./ Turan, N./ Yilmaz, H./ Danir, S. Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. *South african journal of animal science*, 37(2008)1, 21–27.
- Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human and veterinary importance. European Commission, health and consumer protection directorate-general. Available at: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out108_en.pdf.
- Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The European food safety authority journal, 223(2005), 1–12.

- Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on compatibility of the microbial product 035, a preparation of *Bacillus subtilis* with lasalocid sodium, maduramicin ammonium, monensin sodium, narasin, salinomycin sodium and semduramicin sodium. The European food safety authority journal, 575(2007), 1–7.
- Ortwin, S. Microorganisms as feed additives – probiotics. *Advances in Pork Production*, 16(2005), 161–167.
- Pelicano, E.R.L./ De Souta, P.A./ De Souza, H.B.A./ Oba, A./ Norkus, E.A./ Kodawara, L.M./ De lima, T.M.A. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. *Brazilian journal of poultry science*, 5(2003)3, 207–214.
- Sanders, M.E./ Morelli, L./ Tompkins, T.A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(2003), 101–110.
- Spinosa, M.R./ Braccini, T./ Ricca, E./ De Felice, M./ Morelli, L./ Pozzi, G./ Oggioni, M.R. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research in microbiology*, 151(2000), 361–368.
- Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali, 22. 9. 2003.
- Van Immerseel, F./ De Buck, J./ Pasmans, F./ Huyghebaert, G./ Haesebrouck, F./ Ducatelle, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian pathology*, 33(2004), 537–549.