



BAKTERIÁLNA FLÓRA V APENDIXE KRÁLIKOV PRI APLIKÁCII PROBIOTÍK, BAKTERIOCÍNOV A FYTOBIOTÍK

Lauková, A., Chrastinová, L.* Pogány Simonová, M., Szabóová, R., Strompfová, V.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 040 01 Košice,

*Slovenské centrum pre živočíšny výskum – Výskumný ústav živočíšnej výroby, 949 92 Nitra, Slovenská republika

V literatúre sa stretávame s viac či menej rozsiahlym popisom črevnej či cekálnej mikroflóry u jednotlivých skupín zvierat (Kmeť a kol., 1990; Devriese a kol., 1992; Strompfová a Lauková, 2007; Simonová, Lauková, 2007; Lauková a kol., 2009). Inak je tomu v prípade mikroflóry appendixu, a to aj v súvislosti s jej vplyvom resp. dôsledkom na zdravie hostiteľského organizmu. V literatúre sa vyskytujú len ojedinelé práce týkajúce sa výskytu baktérií v appendixe u ľudí a aj tie najmä v súvislosti s výskytom apendicitídy (Leigh a kol., 1974). Popisovaná je dominancia Gram-negatívnej mikroflóry s dôrazom na klebsielly, enterobakterie, či *E. coli*, teda zástupcov z čeľade Enterobacteriace a s výskytom zástupcov striktne anaeróbneho rodu *Bacteroides* (78 %; Leigh a kol., 1974); pričom výskyt Gram-poziívnej mikroflóry je uvádzaný sporadicky. A práve takáto limitovanosť v informovanosti o bakteriálnom obsahu appendixu nás viedla k tomu, aby sme skúsili izolovať tam prítomnú bakteriálnu flórę so zameraním sa hlavne na aeróbne a fakultatívne anaeróbne skupiny mikroorganizmov. Táto myšlienka vystala pri našich experimentoch s aplikovaním naturálnych aditív v ekosystéme králikov, čím sa zaoberáme počas ostatných rokov a aplikujeme hlavne naše vlastné izoláty bakteriocínprodukujúcich kmeňov s probiotickým účinkom, či ich bakteriocín samotné (*Enterococcus faecium* AL41, EF2019-CCM7420, CCM 4231, ent 2019, ent M, Laboratórium živočíšnej mikrobiológie, ÚFHZ SAV, Košice) a pre porovnanie i niektoré fytofytobiotiká (šalvia a *Eleutherococcus senticosus*, Calendula s.r.o., Stará Ľubovňa, prostredníctvom Doc. Šalamona a Doc. Poráčovej z Prešovskej univerzity) s cieľom ovplyvnenia črevnej či cekálnej mikroflóry pre zdravie zvierat, ale v konečnom dôsledku i pre zdravie a spokojnosť spotrebiteľa - konzumenta živočíšnej potravy.

MATERIÁL A METODIKA

Naše experimenty sme uskutočnili v spolupráci s pracoviskom Centra živočíšného výskumu v Nitre na farme Ústavu pre chov malých hospodárskych zvierat, pričom starostlivosť o zvieratá i akákoľvek manipulácia so zvieratami prebiehala so súhlasom Štátnej veterinárnej správy ako i Etických komisií pri obidvoch ústavoch. Jednotlivé experimenty boli organizované postupne v priebehu rokov 2007 až 2009, pričom bolo do pokusu zaraďených 192 zvierat väčšinou samcov vo veku 5 týždňov hybridi Hyla alebo Hycole.

Zvieratá boli umiestnené v štandardných klietkach s prístupom ku vode ad libitum a skrmovali granulovanú diétu pre odchov brojlerových králikov, ktorá neobsahovala kokcidiostatiká. Zvieratá boli rozdelené do 8 skupín po 24 zvierat v každej skupine nasledovne: kontrolná skupina - K, skupina so



skrmovaním kmeňa *E. faecium* AL41 v dávke 500 µl/zviera/deň do vody (koncentrácia 1×10^9 KTJ/ml), skupina so skrmovaním kmeňa *E. faecium* EF2019 (CCM 7420) v dávke 500 µl/zviera/deň do vody (koncentrácia 1×10^9 KTJ/ml), skupina so skrmovaním kmeňa *E. faecium* CCM 4231 v dávke 500 µl/zviera/deň do vody (koncentrácia 1×10^9 KTJ/ml), skupina s podávaním enterocínu 2019 (ent) v dávke 50 µl/zviera/deň do vody, skupina so skrmovaním extraktu šalvie (*Salvia officinalis*) v dávke 10 µl/zviera/deň do vody a rastlinného extraktu *Eleutherococcus senticosus* v krmive v dávke 15 a 30 g/na 100 kg krmiva. Kmene *E. faecium* AL41, CCM 7420 a CCM 4231 sú naše vlastné izoláty (Laboratórium živočíšnej mikrobiológie, ÚFHZ SAV, Košice), ktoré majú probiotické vlastnosti a zároveň produkujú bakteriocíny (Lauková a kol., 1993; Mareková a kol., 2003; Mareková a kol., 2007), ent 2019 je produkovaný kmeňom *E. faecium* CCM 7420 (EF 2019) a ent M je produkovaný kmeňom *E. faecium* AL 41 (Mareková a kol., 2007). Rastlinné extrakty sme si vybrali na základe *in vitro* testov (Haviarová, 2006; Szabóová a kol., 2007, 2008) a rozhodli sme sa pre šalviu, ktorá je známa svojimi antimikrobiálnymi účinkami (Baricevic a kol., 2001) a *El. senticosus*, ktorý je skôr známy svojím imunostimulačným efektom. Experiment trval 42 dní a jednotlivé aplikán-

by boli podávané po dobu 3 týždňov. Vzorky boli odoberané po 3 týždňoch podávania t.j. na 21. deň a po 3 týždňoch od nepodávania, t.j. na konci experimentu, na 42. deň. Zvieratá boli odporážané, 3 kusy z každej skupiny, odobraný bol appendix a obsah appendix bol následne spracovaný štandardnou mikrobiologickou metódou, pričom jednotlivé riedenia boli vysievané na tieto médiá: Brian Heart infusion agar a Trypticase soy agar (Becton a Dickinson, USA) s 3 % prídatkom defibrinovanej baranej krvi, CLED agar, Plate count agar (Biomark). Po kultivácii boli jednotlivé kolónie očkované na Mac Conkey agar a ME-Enterococcus agar. Počty mikroorganizmov boli vyjadrené v KTJ (kolónie tvoriace jednotky) na $g \pm SD$. Štatistický významné rozdiely medzi kontrolou a jednotlivými skupinami ako aj medzi skupinami navzájom boli stanovené Studentovým t-testom, ako aj testom ANOVA.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkové počty baktérií detegovaných v appendixe kontrolnej skupiny boli na 21. deň ako i na 42. deň v podstate rovnaké (Tab. 1). Boli detegované ako Gram-poziívne, tak i Gram-negatívne baktérie. V tejto práci sme sa sice nesústredili na bližšiu špecifikáciu mikroflóry v appendixe, avšak i tak pri náhodnom odplchnutí kolónií boli najčastejšie detegované enterokoky, enterobakterie a *E. coli*. V skupinách králikov s podávanými probiotikami, bakteriocínnimi, či fytofytobiotikami boli najvyššie počty baktérií na 21. deň determinované v skupine, kde bol podávaný kmeň CCM 4231 ($6,82 \pm 0,43$ KTJ/g), ent M ($5,31 \pm 0,77$ KTJ/g), ent 2019 ($5,67 \pm 1,53$ KTJ/g) a šalvia ($<7,0$, Tab. 1); to znamená, že baktérie, ktoré

Tab. 1 Celkové počty baktérií v appendixe králikov po aplikácii a po ukončení aplikácie probiotík, enterocínov a fytofytobiotík – Total counts of bacteria in the rabbit appendix after application of probiotics, enterocins, and fytofytobiotics

Aplikanty	21. deň	42. deň
Kontrola	$5,86 \pm 0,69^b$	$5,45 \pm 0,27^b$
EF 2019 (CCM 7420)	$3,17 \pm 1,32^b$	nd
CCM 4231	$6,82 \pm 0,20^c$	$6,56 \pm 0,44^c$
AL41	$3,76 \pm 1,18^c$	$3,44 \pm 1,21^c$
Ent 2019	<7,0	$5,67 \pm 1,53$
Ent M	$5,31 \pm 0,77$	$3,54 \pm 0,85^c$
Šalvia	<7,0	$7,78 \pm 1,17^c$
El. senticosus	$4,82 \pm 0,43$	$6,10 \pm 0,44$

EF 2019 – *Enterococcus faecium* 2019, CCM 4231 – *E. faecium*, AL 41 – *E. faecium*, Ent 2019, ent M-enterocin, El. senticosus – *Eleutherococcus senticosus*
21. deň – 3. týždne po aplikácii aditív: a,b, $P < 0,01$; a,b,c, $P < 0,01$; 42. deň – 3. týždne od ukončenia aplikácie: a,b, $P < 0,01$; a1,b, $P < 0,05$; a>d, $P < 0,01$, a,e, a,f, e, $P < 0,05$

ré boli zistené v appendixe odolali inhibičnému pôsobeniu daných aplikantov. Je to zaujímavé zistenie, pretože ako vyplýva z našich predchádzajúcich experimentov (Szabóová, 2007; Simonová a kol., 2008; Pogány Simonová a kol., 2009), za *in vitro*, ale i za *in vivo* podmienok, šalvia, ent 2019, ent M i samotný kmeň CCM 4231 sa vyznačujú antimikrobiálnym spektrom účinku a inhibícia sa potvrdila i v truse či v céku králikov. Pravdepodobne sa teda pôsobenie aplikantov koncentrovalo v týchto úsekoch a do appendixu prešli len rezistentnejšie baktérie. Nižšie počty baktérií boli zistené v appendixoch králikov s podávaním rastlinného extraktu *El. senticosus* ($4,82 \pm 0,43$ KTJ/g; Tab. 1). Avšak najnižšie počty boli zaznamenané v skupine králikov, kde boli podávané probiotické kmene EF2019 a AL41 ($3,23 \pm 1,30$ KTJ/g; $3,76 \pm 1,18$ KTJ/g), ktoré sú zároveň i producentmi enterocín A (P) a ent M (Mareková a kol., 2003, 2007; Simonová, Lauková, 2007). Inhibičný efekt obidvoch kmeňov koreloval so štatistikou analýzou, keď pri porovnaní kontrolnej skupiny a skupín so skrmovaním kmeňa EF 2019 (CCM 7420) a AL 41 boli v týchto dvoch skupinách počty baktérií signifikantne znížené oproti kontrole ($P < 0,01$). Kmeň 2019 bol izolovaný z králika a dobre kolonizuje ich tráviaci trakt (Pogány Simonová a kol., 2009), avšak kmeň AL41 je izolátom zo živočíšneho odpadu. Napriek jeho nižšej kolonizácii u králikov (nepublikovaný údaj) v našich predchádzajúcich experimentoch bola zaznamenaná výrazná schopnosť stimulovať imunitný systém. Taktiež bola zaznamenaná vyššia fagocytárná aktívita než u králikov s podávaním kmeňa EF 2019 (Lauková a kol., 2009). Signifikantne nižšie počty baktérií boli zistené v skupine králikov so skrmovaním kmeňov AL41 ako aj EF 2019 - CCM7420 ($P < 0,01$) pri porovnaní so skupinou králikov s kmeňom *E. faecium* CCM 4231, čo znamená, že kmene AL41 a CCM 7420 prejavili vyššiu inhibičnú aktívitu než kmeň CCM 4231. Ale šalvia prejavuje za *in vitro*, ale aj za *in vivo* podmienok (Szabóová a kol., 2009) výrazné antimikrobiálne účinky (Szabóová a kol., 2009), naproti tomu *El. senticosus* má minimálny inhibičný účinok, avšak pôsobí skôr imunostimulačne.

Signifikantne nižšie počty baktérií v skupine králikov so skrmovaním kmeňa AL 41 oproti kontrole ($P < 0,01$) sa prejavili i na 42. deň sledovania teda 3 týždne od nepodávania jednotlivých aplikantov. A rovnaký výsledok bol zistený i v skupine zvierat s ent M ($P < 0,05$; Tab. 1), ktorého producentom je práve kmeň *E. faecium* AL41. V ostatných skupinách boli počty baktérií nezmenené resp. vzrástli (*El. senticosus*), v prípade ent 2019 sa oproti 21. dňu znížili. Pri porovnaní skupín navzájom boli signifikantne nižšie počty v skupine s kmeňom AL 41 ($P < 0,01$) než so šalviou a v porovnaní s kmeňom CCM 4231 ($P < 0,05$), ako aj v skupine s ent M pri porovnaní s kmeňom CCM 4231 ($P < 0,01$). Celkové počty baktérií detegovaných v appendixe kontrolnej skupiny boli na 21. deň ako i na 42. deň v podstate rovnaké. Boli detegované Gram-pozitívne i Gram-negatívne baktérie. Najčastejšie detegované boli enterokoky, enterobaktérie a *E. coli*. Táto štúdia je významným prínosom v rámci mikrobiologického hľadiska málo prebádaného appendixu.

s výsledkami prezentovanými predchádzajúcimi autormi. Nikdy však neboli uvádzané jednotlivé počty detegovaných baktérií. Podstatným zistením je istý modulačný vplyv podávaných aditív na túto mikroflórhu, pričom z hľadiska appendixu sa pohybujeme úplne v novom „poli“, a preto v našich testoch v tomto smere plánujeme pokračovať.

ZÁVER

V skupinách králikov s podávanými probiotikami, bakteriocími, či fytoprotiekami boli najvyššie počty baktérií na 21. deň (3 týždne po podávaní) determinované v skupine s kmeňom *E. faecium* CCM 4231 ($6,82 \pm 0,43$ KTJ/g), s enterocími ent M ($5,31 \pm 0,77$ KTJ/g), ent 2019 ($5,67 \pm 1,53$ KTJ/g) a šalviou ($< 7,0$); to znamená, baktérie, ktoré boli zistené v appendixe odolali inhibičnému pôsobeniu daných aplikantov. Nižšie počty baktérií boli zistené v appendixoch králikov s podávaním rastlinného extraktu *El. senticosus* ($4,82 \pm 0,43$ KTJ/g). Avšak najnižšie počty boli zaznamenané v skupine králikov, kde boli podávané probiotické kmene EF2019 a AL41 ($3,23 \pm 1,30$ KTJ/g; $3,76 \pm 1,18$ KTJ/g), ktoré sú zároveň i producentmi enterocín A (P) a ent M. Inhibičný efekt obidvoch kmeňov koreloval so štatistikou analýzou, keď pri porovnaní kontrolnej skupiny a skupín so skrmovaním kmeňa EF 2019 (CCM 7420) a AL 41 boli v týchto dvoch skupinách počty baktérií signifikantne znížené oproti kontrole ($P < 0,01$). Signifikantne nižšie počty baktérií boli zistené i pri porovnaní skupín králikov so skrmovaním kmeňov AL41 ako aj EF 2019 - CCM7420 ($P < 0,01$) so skupinou králikov s kmeňom *E. faecium* CCM 4231, čo znamená, že kmene AL41 a CCM 7420 prejavili vyššiu inhibičnú aktívitu než kmeň CCM 4231. Signifikantne nižšie počty baktérií v skupine králikov so skrmovaním kmeňa AL 41 oproti kontrole ($P < 0,01$) sa prejavili i na 42. deň sledovania, teda 3 týždne od nepodávania jednotlivých aplikantov. A rovnaký výsledok bol zistený i v skupine zvierat s ent M ($P < 0,05$), ktorého producentom je práve kmeň *E. faecium* AL41. V ostatných skupinách boli počty baktérií nezmenené, resp. vzrástli (*El. senticosus*), v prípade ent 2019 sa oproti 21. dňu znížili. Pri porovnaní skupín navzájom boli signifikantne nižšie počty v skupine s kmeňom AL 41 ($P < 0,01$) než so šalviou a v porovnaní s kmeňom CCM 4231 ($P < 0,05$), ako aj v skupine s ent M pri porovnaní s kmeňom CCM 4231 ($P < 0,01$). Celkové počty baktérií detegovaných v appendixe kontrolnej skupiny boli na 21. deň ako i na 42. deň v podstate rovnaké. Boli detegované Gram-pozitívne i Gram-negatívne baktérie. Najčastejšie detegované boli enterokoky, enterobaktérie a *E. coli*. Táto štúdia je významným prínosom v rámci mikrobiologického hľadiska málo prebádaného appendixu.

SUMMARY

LAUKOVÁ, A., POGÁNY SIMONOVÁ, M., SZABÓOVÁ, R., STROMPOFOVÁ, V.: *Bacterial flora in rabbits appendix in probiotics, bacteriocins and phytobiotics application.*

The highest total bacterial counts were found in the rabbits appendix on day 21 (3 weeks after substances application) and it was in the rabbits receiving the strain *Enterococcus faecium* CCM 4231 ($6,82 \pm 0,43$ CFU/g), enterocin ent M ($5,31 \pm 0,77$ CFU/g), ent 2019 ($5,67 \pm 1,53$ CFU/g) and sage ($< 7,0$); it means, bacteria detected in the appendix were resistant to the substances used. The lower bacterial counts were also determined in the rabbit appendix from the group receiving extract of *Eleutherococcus senticosus* ($4,82 \pm 0,43$ KTJ/g). However, the lowest counts were detected in the rabbits appendix to which probiotic strains were applied - *E. faecium* EF2019 and AL41 ($3,23 \pm 1,30$ CFU/g; $3,76 \pm 1,18$ CFU/g), which also produce enterocins A (P) and ent M. The inhibitory effect of both strains was in correlation with statistic analyses; there, comparing control group and groups with both probiotic strains, significantly low counts were isolated ($P < 0,01$). Significant difference, lower counts of bacteria were also detected comparing the appendix from the rabbits with AL 41 and EF 2019 strains and from those receiving *E. faecium* CCM 4231 ($P < 0,01$). It means, the strains AL 41 and EF2019-CCM7420 were more inhibitory active than *E. faecium* CCM 4231 strain. A significant difference in bacterial counts appendix of rabbits with AL 41 strain ($P < 0,01$) was also found on day 42 (3 weeks after cessation of substances application) in comparison to the control group of animals. The same status was also determined in the rabbits receiving ent M ($P < 0,05$), which is produced by *E. faecium* AL41. In the other groups, the bacterial counts were unchanged and/or increased (*El. senticosus*); in the case of ent 2019, they were found decreased in comparison with their counts on day 21. Comparing the groups among each other on day 42, the significant difference was detected in the rabbits with AL 41 strain ($P < 0,01$) than in rabbits with sage and/or with CCM 4231 strain ($P < 0,05$) as well as in rabbits receiving ent M comparing with the rabbits receiving CCM 4231 strain ($P < 0,01$). The total bacterial counts in the appendix of control rabbits were almost the same on day 21 as well as on day 42. There were detected Gram positive as well as Gram-negative bacteria. The most frequently detected were enterococci, enterobacteriae and *E. coli*. This study is important contribution to the appendix ecc system not known in detail up to now, especially from the microbiological aspect of view.

Literatúra u autorov.

Dosiahnuté výsledky boli vytvorené rezáciou projektu „Centrum excelentnosti pre v skum fyziológie tráviaceho traktu“ - CE 26220120001 na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financované z Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Lektor: R. Nemcová, UVL Košice