

PROBIOTICS, COLONIZATION OF INTESTINAL MICROFLORA AND BROILER PRODUCTION

Dávid Štofán, Kamil Močár, Mária Angelovičová, Daniela Liptaiová

ABSTRACT

Probiotics are rapidly becoming a popular and important tool for preserving the health of animals. The main objective of this study was to evaluate the effect of probiotics on the health and growth of broiler chickens. Feed stuff enriched with 0.10% probiotics was used for this purpose. The experiment was carried out on two groups – control (without addition of probiotics) and experimental group (with addition of 0.10% of probiotics). Samples of caecal chime were collected and the number of *Enterococcus* sp. from 5.79 to 5.85 log CFU.g⁻¹, the number of *Lactobacillus* sp. from 5.48 to 6.88 log CFU.g⁻¹, and the number of *Enterobacteriaceae* sp. from 6.92 to 7.06 log CFU.g⁻¹ was determined. After feeding of feed mixtures with probiotics addition a decrease of *Lactobacillus* sp. and an increase of *Enterococcus* sp. counts was detected. Also the increase of *Enterobacteriaceae* sp. counts in the experimental group comparing with the control group was detected. The viability in trial group (fed with feedstuff enriched with probiotic *Enterococcus faecium* CECT 4515) was 100% while in the control group the viability was 97%. The average body weight of broiler chickens at the end of the experiment in control group was 1376.80 g while the average body weight of chickens at the end of experiment in trial group was 1782.4 g. The difference between these two groups was highly significant (P<0.05).

Keywords: Probiotic, *Enterococcus faecium*, broiler chicken, intestinal microflora, caecum property, feedstuff.

ÚVOD

Slovo probiotikum bolo po prvý raz použité vo význame protikladu k antibiotikám, prípadne ako látka vylučovaná jedným organizmom, ktorá stimuluje rast druhého organizmu (Tannock, 2005).

V súčasnosti je definovaný ako produkt obsahujúce dostatočný počet životaschopných mikroorganizmov, ktoré po kolonizácii menia mikrofóru tráviaceho traktu konzumenta a tým majú pozitívny vplyv na jeho zdravie (Schrezenmer, De Vresse, 2001; Ferenčík, Ebringer, 2002).

Probiotiká ako určité fermentované mliečne produkty sú živé mikroorganizmy, ktoré v adekvátnom množstve majú pozitívny vplyv na hostiteľa (Brown et al., 2005).

Ako živá mikrobiálna kultúra probiotikum priaznivo pôsobí na hostiteľský organizmus zlepšením jeho mikrobiálnej rovnováhy (Tannock, 2002).

Teoretický základ pre výber vhodných probiotických kultúr zahŕňa potravinovú bezpečnosť, funkčnosť (prežitie mikroorganizmov v tráviacom trakte, kolonizáciu tráviaceho traktu, antimikrobiálnu aktivitu a prevenciu proti patogénom) a technologické aspekty (senzorickú charakteristiku, stabilitu) upraveného produktu (Vienderola, Reinheimer, 2003; Cebecci, Gurakan, 2003).

Z hľadiska využitia probiotík v medicíne a vo výžive hospodárskych zvierat je veľmi významný ich biomedicínsky účinok, ktorý spočíva v inhibícii patogénov, optimalizácii tráviacich procesov a stimulácii imunitného systému (Holzapfel et al., 2001; Ishibashi, Yamazaki, 2001; Siezen et al., 2004). Probiotiká majú taktiež pozitívny vplyv na rezistenciu proti *Eimeria acervulina* (Dalloul et al., 2003). Haščík et al. (2005) zároveň konštatujú, že okrem rastlinných extraktov a silíc je možné vo výžive hydiny ako aj iných hospodárskych zvierat využívať aj probiotické, resp. prebiotické prípravky ako náhradu za antibiotiká.

Je však dôležité zhodnotiť typ probiotík použitých na kŕmne účely, keďže probiotické kultúry zložené z

viacerých kmeňov mikroorganizmov majú vyšší účinok hlavne pri brojlerových kurčatách (Timmerman et al., 2004). Chrastinová et al. (2008) dodáva, že pri vysokej koncentrácii zvierat v chovných priestoroch dochádza ku stresom a častejšiemu prenosu infekcií, následkom čoho klesá produkcia, zhoršuje sa zdravotný stav a stúpa aj úhyn. Po úplnom zákaze používania kŕmnych antibiotík a stimulátorov rastu v štátoch EÚ sa uplatňujú biologické metódy stimulácie a usmerňovania úžitkovosti a znižovania chorobnosti zvierat používaním neškodných biologických prípravkov, hlavne probiotík. Využívaním probiotík sa usmerňujú fyziologické procesy, ktorými sa ovplyvňuje rast zvierat, úžitkovosť, zvyšuje sa odolnosť voči infekčným chorobám a zlepšuje sa zdravotný stav.

Cieľom tejto práce bolo experimentálne overenie vplyvu probiotík podávaných *per os* na osídlenie črevnej mikroflóry, životaschopnosť a samotný produkčný rast brojlerových kurčiat.

MATERIAL A METODIKA

V experimente s brojlerovými kurčatami sme sa zamerali na pozorovanie vplyvu probiotík v dvoch skupinách, kde bolo aplikované probiotikum na báze *Enterococcus faecium* do kŕmnych zmesí v nasledovnej schéme: KS (kontrolná skupina) - bez prídavku probiotika a PS (pokusná skupina) – s prídavkom 0,10 % probiotika.

Ako biologický materiál boli použité jednodňové kurčatá určené na produkciu mäsa Ross 308. Experiment bol uskutočnený v hydinarskej farme, v hale s možnosťou výkrmu 24 000 ks kurčiat. Vytvorili sme 2 boxy ktoré sme vzájomne medzi sebou oddelili perforovaným pletivom od haly a plastovými ohradami medzi sebou. V každom boxe bolo umiestnených 100 ks kurčiat. Veľkosť plochy v každom boxe umožňoval kurčatám neobmedzený prístup ku krmivu a vode, ako aj vykonávanie prirodzených aktivít. Kurčatá boli chované na hlboknej podstielke. Spodná vrstva podstielky do výšky 8 cm pozostávala z drevných pilín a vrchná vrstva vo výške 5 cm bola z pomiaganej pšeničnej slamy. Celkové experimentálne obdobie bolo rozdelené na

tri fázy: štartérová (od 1. do 18. dňa veku kurčiat), počas ktorej kurčatá prijímali štartérovú krmnú zmes (HYD-01), rastová (od 19. do 31. dňa veku kurčiat), s rastovou krmnou zmesou HYD-02, finálna (od 32. do 38. dňa veku kurčiat), s finálnou krmnou zmesou HYD-03.

Krmne zmesi určené pre brojlerové kurčatá boli vybilancované na obsah živín a metabolizovateľnej energie v súlade s ich potrebami.

Tabuľka 1 Schéma pokusov

Typ kurčiat	Fáza experimentu a krmná zmes	Skupina	Pokusná účinná látka v krmných zmesiach
Ross 308	štartérová, HYD-01 rastová, HYD-02 finálna, HYD-03	kontrolná	-
	štartérová, HYD-01 rastová, HYD-02 finálna, HYD-03	pokusná	0,10% probiotika

Sledované mikrobiologické ukazovatele:

Počet KTJ (kolónie tvoriace jednotky) *Enterococcus* sp. na Slanetz-Bartley agare po inkubácii 48 až 72 hodín pri teplote 37 °C. Počet KTJ *Lactobacillus* sp. na MRS

agare po inkubácii 72 hodín pri teplote 37 °C. Počet KTJ *Enterobacteriaceae* sp. na McConkey agare po inkubácii 24–48 hodín pri teplote 37 °C.

Tabuľka 2 Sledované mikrobiologické ukazovatele

Kultivovaný druh	Živné pôdy	Spôsob očkovania	Použitie riedenie	Pôdy vo vzťahu k O ₂	Teplota kultivácie	Čas kultivácie
<i>Enterobacteriaceae</i> sp.	McConkey agar	zaliatím	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁶	aeróbne	37 °C	48 – 72 h
<i>Enterococcus</i> sp.	Slanetz-Bartley agar	zaliatím	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	aeróbne	37 °C	48 – 72 h
<i>Lactobacillus</i> sp.	MRS agar	zaliatím	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	aeróbne	37 °C	24 h

McConkey agar – Biomark laboratories, Pune (India)

Slanetz-Bartley agar, MRS agar – Imuna, Šarišské Michaľany

Pre vyhodnotenie mikrobiologických výsledkov sme použili platňovú zriedňovaciu metódu. Základné riedenie bolo: 1 g chýmu + 99 ml fyziologického roztoku (0,85 % NaCl) podľa desiatkového systému riedenia. Základné riedenie (10⁻¹) sme pripravili zmiešaním 5 g vzorky a 45 ml fyziologického roztoku, prípadne 10 g vzorky a 90 ml fyziologického roztoku. Zmes sme homogenizovali na trepacom zariadení počas 30 min. Zo základného riedenia sme pripravili ďalšie, podľa desiatkového systému riedenia. Vzorky sme očkovali povrchovo alebo zaliatím. Naočkované Petriho misky sme kultivovali v termostate dnom nahor. Teplotu a čas sme prispôbili skupine kultivovaných mikroorganizmov. Po kultivácii sme spočítali kolónie na miskách. Pre výpočet KTJ.g⁻¹ sme použili nasledovný vzorec (v ktorom berieme do úvahy misky z dvoch za sebou idúcich riedení):

$$N = \sum C / [(n_1 + 0,1n_2) \cdot d]$$

$\sum C$ – súčet charakteristických kolónií na vybraných miskách,

n_1 – počet misiek z 1. riedenia použitého na výpočet,

n_2 – počet misiek z 2. riedenia použitého na výpočet,

d – riediaci faktor zhodný s 1. použitým riedením (STN EN ISO 4833, 1997).

Na očkovanie sme použili riedenia 10⁻⁴, 10⁻⁵ a 10⁻⁶. Použitie spôsoby očkovania a kultivácie sú uvedené v tabuľke 2. Výsledky sme vyhodnotili podľa základnej štatistickej charakteristiky (aritmetický priemer) v programe Microsoft Office Excel 2007.

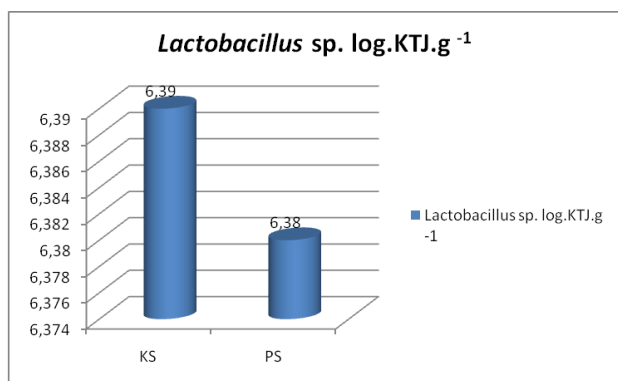
Životaschopnosť výkrmových kurčiat (úhyn) Ross 308 sme vykonávali dennou kontrolou experimentu.

Telesnú hmotnosť kurčiat na konci experimentu sme sledovali vážením na váhach typu Kern ECB 20K20 s presnosťou $d \pm 0,1$ g.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

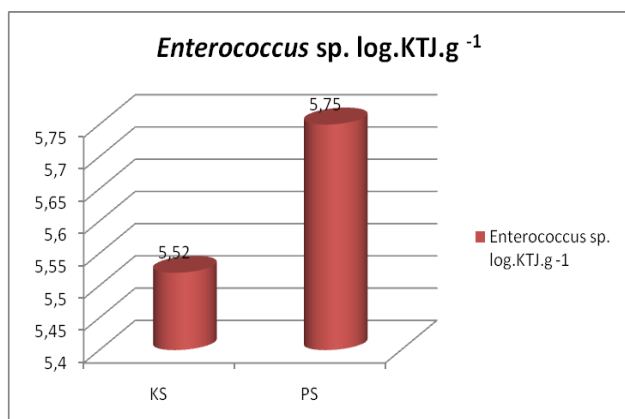
Existujú mnohé dôkazy potvrdzujúce klinickú aplikáciu probiotík pri liečbe a prevencii ochorení tráviaceho traktu a tým celkového zlepšenia zdravotného stavu (Gardiner et al., 2002).

V našom experimente sme sledovali osídlenie mikroorganizmov v tráviacom trakte brojlerových kurčiat. Počet *Lactobacillus* sp. (graf 1) bol v pokusnej skupine v rozmedzí od 5,81 do 6,78 log KTJ.g⁻¹. Najvyšší priemerný počet log KTJ.g⁻¹ *Lactobacillus* sp. 6,39 log KTJ.g⁻¹ bol v kontrolnej skupine. V porovnaní s kontrolnou skupinou sme zaznamenali nižšie počty *Lactobacillus* sp. v pokusnej skupine. Jin et al. (1998) zaznamenali vyššie počty *Lactobacillus* sp. v pokuse, ktorý bol však hlavne na báze probiotických kultúr *Lactobacillus* sp. Nízke počty *Lactobacillus* sp. môžu mať rôzne dôvody, kompetitíciu v tráviacom trakte ako aj vekom hostiteľa (Jin et al., 1997) a taktiež vysokou špecifitou použitého kmeňa mikroorganizmu (Goodling et al., 1987).



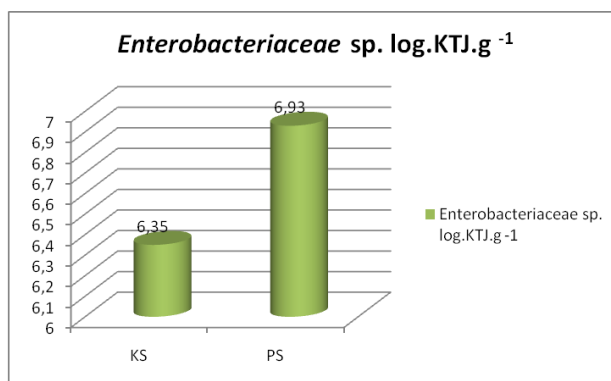
Graf 1 Priemerné počty *Lactobacillus sp.* v tráviacom trakte KS (kontrolná skupina) - bez prídavku probiotika a PS (pokusná skupina) - 0,10 % probiotika

Počet *Enterococcus sp.* (Graf 2) bol v rozmedzí od 5,79 do 5,85 log KTJ.g⁻¹. Najvyšší priemerný počet log KTJ.g⁻¹ *Enterococcus sp.* bol zaznamenaný v pokusnej skupine (5,75 log KTJ.g⁻¹), kde boli kurčatá kŕmené krmivom s prídavkom probiotika. Počty *Enterococcus sp.* v kontrolnej skupine boli značne nižšie (5,52 log KTJ.g⁻¹). Výsledky **Alcicek et al. (2004)** taktiež potvrdzujú že použitie *Enterococcus sp.* vhodne ovplyvňuje mikroflóru tráviaceho traktu a má potenciál pri redukcii patogénov.



Graf 2 Priemerné počty *Enterococcus sp.* v tráviacom trakte KS kontrolná skupina) - bez prídavku probiotika a PS (pokusná skupina) - 0,10 % probiotika

Počet *Enterobacteriaceae sp.* (Graf 3) sa pohyboval v rozmedzí od 6,92 do 7,06 log KTJ.g⁻¹. Najvyšší priemerný počet log KTJ.g⁻¹ *Enterobacteriaceae sp.* bol zaznamenaný v pokusnej skupine (6,93 log KTJ.g⁻¹).



Graf 3 Priemerné počty *Enterobacteriaceae sp.* v tráviacom trakte KS (kontrolná skupina) – bez prídavku probiotika a PS (pokusná skupina) - 0,10 % probiotika

Životaschopnosť výkrmových kurčiat

Črevná mikroflóra môže byť kontaminovaná patogénmi, ktoré negatívne ovplyvnia osídlenie bežnými mikroorganizmami v čreve. To je dôvod používania určitých doplnkov ku krmivám zvierat s cieľom udržať alebo dokonca vylepšiť rovnováhu črevnej mikroflóry (**Gibson, Fuller, 2000**). Počas experimentu bola denne kontrolovaná životaschopnosť kurčiat, ktorú sme vyjadrili počtom živých kurčiat na konci pokusu po odrátaní uhynutých kusov. Úhyn kurčiat sme zaznamenali len v kontrolnej skupine, a to v počte 3 kusy (97 % životaschopnosť). Príčiny úhynu neboli veterinárne vyšetrované.

Telesná hmotnosť kurčiat na konci experimentu

Telesná hmotnosť kurčiat bola vo veku 38 deň 1376,80 g v kontrolnej skupine a 1782,40 g v pokusnej skupine. Rozdiely v telesnej hmotnosti kurčiat na konci pokusu v sledovanom experimente s kurčatami určenými na produkciu mäsa Ross 308 boli štatisticky vysoko preukazné (P<0,05).



Graf 4 Telesná hmotnosť výkrmových kurčiat na konci pokusu [g]

Tabuľka 3 Matematicko-štatistické vyhodnotenie výsledkov telesnej hmotnosti brojlerových kurčiat na konci experimentu a ich rozdielov medzi skupinami

Skupina	n	s [g]	v _k	t-test
				Štatistické porovnanie (K:P)
Kontrolná (K)	100	131,87	9,58	+P<0,05
Pokusná (P)	100	151,36	8,49	

ZÁVER

Výsledky experimentu naznačujú, že použitie probiotík na báze *Enterococcus faecium* ako kŕmneho prídavku do kŕmnych zmesí má pozitívny vplyv na osídlenie tráviaceho traktu kurčiat určených na produkciu mäsa a tým aj pozitívny účinok na ich zdravie a produkčný rast. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že probiotikum priaznivo ovplyvňuje kolonizáciu tráviaceho traktu *Enterococcus* sp. V porovnaní s kontrolnou skupinou boli počty *Enterococcus* sp. značne vyššie. Účinkami *Enterococcus faecium* sa počty *Lactobacillus* sp. pohybovali v priemere okolo $6,38 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Počty *Enterococcus* sp. boli v priemere okolo $5,75 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. Taktiež sme zaznamenali zvýšené množstvo *Enterobacteriaceae* sp. v priemere $6,93 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, čo môže byť následkom vysokej kompetície v tráviacom trakte. Životaschopnosť kurčiat v kontrolnej skupine bola 97 % a v pokusnej skupine sme nezaznamenali žiadny úhyn. Telesná hmotnosť kurčiat na konci experimentu bola 1376,80 g v kontrolnej skupine a 1782,40 g v pokusnej skupine, ktorých rozdiely boli štatisticky vysoko preukazné ($P < 0,05$). Z hľadiska dosiahnutých výsledkov odporúčame vo výžive kurčiat Ross 308 použiť probiotický preparát na báze *Enterococcus faecium*.

PodĎakovanie: Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou prostredníctvom finančnej podpory č. VEGA 1/0509/08.

LITERATÚRA

- ALCICEK, A., BOZKURT, M., CABUK, M., 2004. The effect of a mixture of herbal essential oils, an organic acid or a probiotic on broiler performance. In *South African Journal of Animal Science*, vol. 4, 2004, no. 34, p. 217-222.
- BROWN, A.C., SHOVIĆ, A., IBRAHIM, S. A., 2005. A non-dairy probiotic's (poi) influence on changing the gastrointestinal tract's microflora environment. In *Alternative Therapies in Health and Medicine*, vol. 11, 2005, no.1, p. 58-64.
- CEBECCI, A., GURAKAN, C., 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains, In *Food Microbiology*, vol. 20, 2003, p. 511-518.
- DALLOUL, R.A., LILLEHOJ, H.S., SHELLEM, T.A., DOERR, J.A., 2003. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulinum* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. In *Poultry science*, vol. 82, 2003, p. 62-66.
- FERENČÍK, M., EBRINGER, L., 2002. Možnosti využitia probiotík v prevencii a terapii alergických chorôb. In *Alergie*, roč. 10, 2002, s. 1-9.
- FITZGERALD, G., 2002. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, no. 9, p. 749-756.
- GARDINER, G. E., BOUCHIER, P., O'SULLIVAN, E., KELLY, J., KEVIN COLLINS, J., GOODLING, A.C., CERNIGLIA, G. J., HEBERT, J. A., 1987. Production performance of White Leghorn layers fed *Lactobacillus* fermentation products. In *Poultry Science*, vol. 66, 1987 p. 480-486.
- GIBSON, G. R., FULLER, R. 2000. Aspects of in vivo research approaches directed toward identifying probiotics for human use. In *J. Nutri.*, 2000, no. 130, p. 391-395.
- HAŠČÍK, P., WEIS, J., ČUBOŇ, J., 2005 Effects of a probiotic preparation in complete diets for ROSS 308 broiler Dickens on chemical composition of meat In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 8, 2005, n. 1, p. 20-24.
- HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2001, p. 365-373.
- CHRASTINOVÁ, Ľ., CHREŇKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., SIMONOVÁ, M., SZABÓOVÁ, R., STROMPFOVÁ, V., PLACHÁ, I., VASILKOVÁ, Z., RAFAY, J., ONDRUŠKA, Ľ., CHLEBEC, I., POLAČIKOVÁ, M., 2008. Probiotiká a rastlinné silice vo výžive králikov. In *Dni výživy zvierat*. Nitra : SPU, 2008, s. 108-113.
- ISHIBASHI, N., YAMAZAKI, S., 2001. Probiotics and safety. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2001, no. 2, p. 465-470.
- JIN, L.Z., HO, Y. W., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S., 1997. Probiotics in poultry: modes of action. In *World's Poultry Science Journal*, vol. 53, 1997, p. 351-368.
- JIN, L. Z., HO, Y. W., ABDULLAH, S., JULALUDIN, S., 1998. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. In *Poultry science*, vol. 77, 1998, p. 1259-1265.
- SCHREZENMEIR, J., DE VRESSE, M., 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching and definition. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, 2001, p. 361-364.
- SIEZEN, R. J., VAN ENCKRVORT, F. H., KLEERENEZEN, M., TEUSINK, B., 2004. Genome data mining of lactic acid bacteria the impact of bioinformatics. In *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 15, 2004, no. 2, p. 105-115.
- TANNOCK, G. W., 2002. *Probiotics and prebiotics: Where are we going?* Otago : Caister Academic Press, 2002. 336 p. ISBN 0-954-5464-1-1.
- TANNOCK, G.W., 2005. *Probiotics and prebiotics: Scientific aspects*. Otago : Caister Academic Press, 2005. 230 p. ISBN 1-904455-01-8.
- TIMMERMAN, H. M., KONING, C. J. M., MULDER, L., ROMBOUTS, F. M., BEYNEN, A. C., 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. In *International journal of Food Microbiology*, vol. 96, 2004, p. 219-233.
- STN EN ISO 4833: 1997, *Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mikroorganizmov. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C*.
- VINDEROLA, C. G., REINHEIMER, J. A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance, In *Food Research International*, vol. 36, 2003, p. 895-904.

Kontaktná adresa

Ing. Dávid Štofán, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHBP, Tr. Andreja Hlinku 2., 949 76 Nitra. Tel.: +421/37/641 5808, E-mail: david.frovn@lycos.com

Ing. Kamil Močár, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHBP, Tr. Andreja Hlinku 2., 949 76 Nitra. Tel.: +421/37/641 5808, E-mail: kmocar@gmail.com

Ing. Daniela Liptaiová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHBP, Tr. Andreja Hlinku 2., 949 76 Nitra. Tel.: +421/37/641 5808, E-mail: daniela.liptaiova@uniag.sk

Prof. Ing. Mária Angelovičová, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KHBP, Tr. Andreja Hlinku 2., 949 76 Nitra. Tel.: +421/37/641 5808, E-mail: maria.angelovicova@uniag.sk