

## NAČIN DELOVANJA IN UČINKI PROBIOTIKOV V PREHRANI ŽIVALI

Maša VODOVNIK <sup>a)</sup> in Romana MARINŠEK-LOGAR <sup>b)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, asist.

<sup>b)</sup> Isti naslov kot <sup>a)</sup>, izr. prof., dr., mag.

Delo je prispelo 04. novembra 2008, sprejeto 17. novembra 2008.

Received November 04, 2008, accepted November 17, 2008.

### IZVLEČEK

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki zaužiti v ustreznem številu, ugodno vplivajo na zdravje gostitelja. Njihovi učinki so praviloma povezani z vzpostavitvijo ugodnega mikrobnege ravnovesja v prebavilih gostitelja ter uravnavanjem njegovega imunskega odziva. Pri domačih živalih so ključni učinki probiotikov povezani z izboljšano učinkovitostjo prireje. Poleg ugodnega vpliva na zdravstveno stanje (predvsem mladih) živali, slednje obsega tudi izboljšano konverzijo krme, povečano hitrost rasti in nekatere druge. Probiotični krmni dodatki registrirani v EU vsebujejo predvsem Gram-pozitivne bakterije iz rodov *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ter kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in *Kluyveromyces sp.* Medtem, ko je večina omenjenih mikroorganizmov načeloma varnih, imajo nekateri lastnosti, ki so lahko škodljive tako za živali, kot tudi za ljudi. Tak primer so enterokoki, pri katerih pogosto opažajo zapise za prenosljive determinante odpornosti proti antibiotikom. Slednji tako predstavljajo potencialno nevarnost za širjenje odpornosti v patogenih mikrobih populacijah ljudi in živali. Hiter napredek na področju sintetične in systemske biologije združen s podporo bioinformatike in novimi orodji genskega inženirstva v prihodnosti obeta skoraj neskončne možnosti za pripravo probiotičnih sevov s poljubnimi lastnostmi, vendar pa bodo le-ti lahko prestopili meje laboratorijev šele ob ustrezni spremembi zakonodaje in javnega mnenja.

Ključne besede: živinoreja / prehrana živali / mikrobiologija / probiotiki / krma / rekombinantni probiotiki / zakonodaja / EU

### PROBIOTICS IN ANIMAL NUTRITION

#### ABSTRACT

Probiotics are defined as living micro-organisms, that upon ingestion in certain numbers, exert health benefits to the host. Their use is linked to proven efficacy on the gastrointestinal microbial equilibrium as well as immunomodulation. The positive effect in animals exerts not only in an improved health status, especially in young animals, but also in improved animal performance, including growth rate and feed conversion efficiency. Microorganisms that are used in animal feeds in the EU are mainly Gram-positive bacteria belonging to genera *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Streptococcus* and yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Kluyveromyces* species. While most of the species are apparently safe, certain microorganisms may exert harmful properties for animals as well as humans. Enterococci, for example, might harbour transmissible antibiotic resistance determinants, which have the potential to spread in animal and human-associated pathogenic microbial populations. Recent developments in synthetic and systems biology, coupled with bioinformatics and novel tools for genetic engineering, will soon enable the construction of 'artificial' probiotic microorganisms with virtually any combination of properties. Whether and when these 'designer probiotics' will reach out of the labs depends on legislation as well as public opinion.

Key words: animal production / animal nutrition / microbiology / probiotics / feed / recombinant probiotics / legislation / EU

## UVOD

Koncept probiotikov se je začel razvijati v zgodnjih letih 20. stoletja, ko je Nobelov nagradjenec Elie Metchnikoff predpostavil povezavo med dolgoživostjo bolgarskih kmetov in njihovim uživanjem velikih količin fermentiranih mlečnih izdelkov. Verjel je, da se z uživanjem ustreznih količin tovrstnih izdelkov v prebavila vnesejo mlečnokislinske bakterije, ki se tam razmnožijo in preprečijo rast škodljivim mikroorganizmom (Tannock, 2003). V 50. letih prejšnjega stoletja so pri USDA (United States Department of Agriculture) registrirali prvi probiotični izdelek, ki naj bi pomagal pri prašičji griži, kot posledici okužbe z *E. coli* (Orrhage in sod, 1994). Število probiotikov, namenjenih preventivi in lajšanju različnih bolezenskih stanj pri ljudeh in živalih, od tedaj strmo narašča. Medtem, ko se probiotični pripravki, namenjeni ljudem, uvrščajo med prehranske izdelke oziroma prehranska dopolnila (redkeje tudi zdravila), probiotični krmni dodatki veljajo za alternativne rastne pospeševalce. Njihov prodor na tržišče je v Evropi podvržen strogi regulativi z leta 2003 (EC 1831/2003). Kljub vsemu probiotiki zasedajo pomembno mesto med krmnimi dodatki, njihova vloga v živalski produkciji pa se je v Evropi še dodatno okrepila ob prepovedi uporabe krmnih antibiotikov, leta 2006 (Anadon, 2006a).

## POMEN PROBIOTIKOV PRI VZDRŽEVANJU MIKROBNEGA RAVNOVESJA V PREBAVILIH ŽIVALI

"Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki zaužiti v ustreznem številu ugodno vplivajo na zdravje gostitelja" se glasi definicija, ki sta jo leta 2001 družno predlagala FAO in WHO (Khan in Ansari, 2007; Maldonado Galdeano in sod., 2007). V splošnem velja, da probiotiki na fiziologijo gostitelja vplivajo s spreminjanjem oziroma vzpostavljanjem ugodnega mikrobnega ravnovesja v prebavnem traktu oziroma preko zmernega spodbujanja njegovega imunskega sistema. Ključna tarča delovanja probiotikov je prebavni trakt (GIT) gostitelja, še posebno predeli, ki so že naravno najgostejše poseljeni z mikrobi. Pri monogastričnih živalih in ljudeh so to različni deli črevesja, kjer poteka mikrobna razgradnja vlaknin in drugih snovi, ki jih gostitelj ni mogel razgraditi in absorbirati v prednjih delih prebavil. Poleg vloge pri prebavi in absorpciji hranil, predstavlja črevesna sluznica tudi največji telesni imunski organ in prvo obrambno linijo proti vdoru patogenov (Gilmore in Faretti, 2003). V nasprotju z monogastričnimi živalmi, pri prežvekovalcih večji del mikrobne aktivnosti poteka v delu prebavnega trakta pred želodcem. Avtohtona mikrobna združba v vampu, ki je sestavljena iz množice bakterij ter nekaterih gliv in praživali, igra ključno vlogo pri pridobivanju energije iz rastlinskih strukturnih polisaharidov, poleg tega pa predstavlja za gostitelja tudi vir beljakovin. Tako pri monogastričnih živalih kot pri prežvekovalcih lahko pride do porušena ustreznega mikrobnega ravnovesja, kar se odraža na zdravju in proizvodnosti živali. Najpomembnejši razlogi za to so stres (ob brejosti, odstavitvi, transportu...), drastične spremembe v sestavi ali slaba kakovost krme ter neustrezna higiena krmljenja. Eden najpogostejših primerov porušena mikrobne homeostaze zaradi neustrezne sestave krme je vampna acidoza. Do omenjenega stanja lahko pride, če prežvekovalec zaužije prevelik delež lahko razgradljivih ogljikovih hidratov (škroba, sladkorjev). Posledično pride v vampu do hitrega porasta skupine mikroorganizmov, ki fermentirajo omenjene substrate (predvsem nekaterih vrst iz rodov *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Ruminobacter*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Succinimonas* in *Succinivibrio*) na račun zmanjšanja preostalih. Spremembe v fermentacijskih vzorcih vodijo do povečane akumulacije organskih kislin, predvsem laktata (ključno vlogo pri tem pripisujejo predvsem vrsti *S. bovis* ter homofermentativnim vrstam rodu *Lactobacillus*). Posledica je pretirano znižanje pH vampa ter popolno porušenje mikrobnega ravnotežja v vampu, kar pri gostitelju povzroči različne negativne fiziološke spremembe, ki vplivajo na zdravje in počutje živali (Nagaraja in Titgemeyer, 2007; Chaucheyras-Durand, 2008; Chiquette in sod., 2008). Stresni pogoji

najpogosteje vplivajo na povečano tveganje za infekcije s patogenimi mikroorganizmi. Ob stresu namreč pride poleg oslabitve imunskega sistema tudi do sprememb v izločanju prebavnih sokov ter peristaltiki črevesja (Berezina in Ovsyannikov, 2001), kar vodi v spremembe fizikalno-kemijskih parametrov, kot sta pH in redoks potencial, znotraj različnih delov prebavnega trakta. Spremenjeni pogoji favorizirajo drugačno sestavo mikrobne združbe, v kateri se lahko uveljavijo tudi patogeni.

## SPLOŠNE LASTNOSTI PROBIOTIKOV

Probiotični sevi morajo biti za gostitelja varni, hkrati pa izkazovati tudi ustrezno mero učinkovitosti, torej merljivih učinkov na zdravje oziroma proizvodnost živali. Zahteva po varnosti vključuje odsotnost nevarnosti za sistemske infekcije, poleg tega pa mikroorganizmi oziroma njihovi metaboliti ne smejo kazati učinkov toksičnosti za gostitelja, ne smejo proizvajati toksinov ter drugih virulenčnih dejavnikov. Eden pomembnejših vidikov varnosti je v zadnjem času postala tudi odsotnost prenosljivih determinant antibiotične rezistence, torej zapisov za odpornost proti antibiotikom, ki se nahajajo na plazmidih, transpozonih ali drugih vrstah mobilnih genetskih elementov (Anadon in sod., 2006b; Becquet, 2003).

Da bi probiotiki lahko dosegli ustrezno aktivnost na tarčnem mestu morajo posedovati specifične fiziološke lastnosti, ki jim omogočajo preživetje ob prehodu skozi vse dele prebavil. Takšne lastnosti so na primer odpornost proti kislini (želodčni sok), žolčnim solem in proteazam, ter zmožnost metabolne aktivnosti v odsotnosti kisika. Poleg tega je pri probiotikih, namenjenih živalim, zelo pomembna sposobnost preživetja različnih (agresivnih) tehnoloških postopkov priprave krme (briketiranje, peletiranje, ekspanziranje) in ohranitev živosti tudi po daljšem času skladiščenja (Simon, 2005).

## VRSTE PROBIOTIKOV

V splošnem lahko probiotične mikroorganizme glede na izvorni ekosistem razdelimo v dve skupini. Prvo skupino sestavljajo vrste, katerih naravno življenjsko okolje je prebavni trakt ljudi ali živali (predstavljajo del avtohtone ali indigene mikrobne populacije GIT). Takšne so na primer mnoge vrste mlečnokislinskih bakterij iz rodov *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. farciminis*) in *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. thermophila*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*), pa tudi *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*), *Pediococcus* (*P. acidilactici*) in *Streptococcus* (*S. infantarius*). Prednost te skupine probiotičnih mikroorganizmov je, da so že naravno prilagojeni na fizikalno-kemijske razmere, ki vladajo znotraj prebavnega trakta gostitelja, medtem ko njihovo uporabo v živalski prehrani omejuje nestabilnost med pripravo in skladiščenjem krme (Anadon in sod., 2006b; Simon, 2005). Pri rodu *Enterococcus* se pojavlja tudi težava pogoste prisotnosti mobilnih determinant antibiotične rezistence. Gre predvsem za transpozicijske elemente z zapisom za odpornost proti glikopeptidnemu antibiotiku vankomicinu, ki so vključeni v konjugativne plazmide (Garcia-Migura in sod., 2007).

V zadnjem času se kot probiotični kandidati preizkušajo tudi nekateri anaerobni izolati iz vampa, kot sta *Prevotella bryantii* 25A in *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5. Medtem, ko prvi kaže potencial za preprečevanje vampne acidoze, so pri drugem opazili več lastnosti, ki bi lahko bile koristne tako za prežvekovalce, kot za monogastrične živali. Širšo uporabo omenjenih mikroorganizmov omejuje predvsem občutljivost na prisotnost kisika, vdor katerega je med postopki priprave, shranjevanja in uporabe probiotikov težko preprečiti (Chiquette in sod., 2008; Čepeljnik in sod., 2003; 2006).

V probiotičnih dodatkih živalski krmi zelo pogosto najdemo mikroorganizme, ki niso del avtohtone mikrobiote prebavnega trakta. V to skupino spadajo različne vrste rodu *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. clausii*, *B. coagulans*), dva tesna sorodnika omenjenega rodu, *Paenybacillus polymyxa* in *Brevibacillus laterosporus* ter nekatere kvasovke (*S. cerevisiae*, *Kluyveromyces* spp.). Najpogosteje uporabljeni probiotiki omenjene skupine so endospore gram-pozitivnih bakterij iz rodu *Bacillus*, ki se odlikujejo po izjemni odpornosti na zunanje pogoje, zaradi česar ohranjajo visoko viabilnost tako med procesi priprave krme, skladiščenjem in prehodom skozi različne dele prebavnega trakta. Neugodna lastnost nekaterih sevov *B. cereus* in *B. licheniformis* je zmožnost proizvodnje toksinov, zato je pred uporabo v živalski prehrani potrebno seve testirati na prisotnost omenjenih virulencnih dejavnikov (Simon, 2005; Anadon in sod., 2006b; Hong in sod., 2005).

## MEHANIZMI DELOVANJA PROBIOTIKOV

Mehanizmi delovanja probiotikov še niso najboljše preučeni, kar je predvsem posledica pomanjkanja neposrednih dokazov. Sklepanje o večini izmed njih namreč izhaja iz "in vitro" poskusov, kjer pogoji nikoli niso enaki tistim v kompleksnem naravnem ekosistemu, kot so prebavila. Kljub vsemu se je v znanstveni literaturi utrdilo mnenje, da sta za delovanje probiotikov ključna dva osnovna mehanizma: kompetitivno izločanje patogenov ter za gostitelja ugodno uravnavanje imunskega sistema (imunomodulacija).

Koncept kompetitivnega izločanja zaobjema širok spekter različnih potencialnih mehanizmov. Eden od splošnejših je spreminjanje fizioloških pogojev (pH, redoks potenciala), ki se odraža kot posledica spreminjanja ravnotežja produktov mikrobnega metabolizma. Ugodne učinke, ki so jih pri prežvekovalcih opazili ob dodajanju kvasovke *S. cerevisiae*, na primer, med drugim povezujejo s povečano porabo kisika v vampu, kot posledico respiratorne aktivnosti tega fakultativno anaerobnega mikroorganizma. Ustrezno nizek redoks potencial v tem ekosistemu je namreč pglavitnega pomena za mnoge celulolitične bakterije in druge striktno anaerobne predstavnike vampne mikrobne združbe (Fonty, 2006; Newbold, 1996). Poleg tega naj bi probiotične kvasovke preko preprečevanja akumulacije laktata uravnavale tudi pH vampa, zaradi česar se uporabljajo za preprečevanje vampne acidoze (Fonty, 2006; Marden in sod., 2008). Po drugi strani pa je prav izločanje kratkoverižnih karboksilnih kislin (SCCA) eden od mehanizmov, s katerimi mlečnokislinske bakterije inhibirajo patogene v prebavnem traktu monogastričnih živali (De Vuyst in Leroy, 2007).

Poleg nespecifičnega spreminjanja fizikalno-kemijskih pogojev med predpostavljene mehanizme spada tudi tekmovanje za hranila in vezavna mesta, običajno sluznične receptorje (Hong in sod., 2005; Tuohy in sod., 2003). Kompeticija za vezavna mesta pa ni edini način onemogočanja vezave patogenov, saj lahko probiotični mikroorganizmi vplivajo na ta proces tudi posredno, preko regulacije izražanja gostiteljevih genov. Tako so na primer dokazali, da probiotična seva *L. plantarum* 299v in *L. rhamnosus* GG 'in vitro' kvantitativno inhibirata pritrjanje enteropatogene *E. coli* na epitelijske celice črevesja preko stimulacije izražanja genov z zapisi za mucina MUC-2 in MUC-3 (Mack in sod., 1999).

Eden najpomembnejših mehanizmov zaviranja patogenov s strani probiotičnih mikroorganizmov je proizvodnja protimikrobnih snovi. Protimikrobno delovanje mlečnokislinskih bakterij pripisujejo širokemu spektru bioaktivnih spojin, med katere sodijo poleg produktov primarnega metabolizma, kot so organske kisline, etanol in maščobne kisline, tudi vodikov peroksid, bakteriocini ter bakteriocinom podobne inhibitorne spojine (BLIS). Med slednjimi so pogoste peptidne molekule s protiglivnim delovanjem, nekateri sevi pa naj bi proizvajali celo protivirusne beljakovine (De Vuyst in Leroy, 2007; Saito, 2003; Tannock, 2006). Pri različnih vrstah rodu *Bacillus* so prav tako dokazali proizvodnjo različnih bakteriocinov, kot

tudi bakteriocinom podobnih inhibitornih spojin in antibiotikov. Nekateri sevi *B. subtilis* na primer proizvajajo toplotno stabilen in na razgradnjo s proteazami odporen antibiotik (aminocoumacin A), ki je aktiven proti vrstam *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni* in *Helicobacter pylori*, medtem ko probiotični sevi vrste *B. coagulans* proizvajajo za proteaze občutljive peptidne molekule, z aktivnostjo proti Gram-pozitivnim bakterijam (koagulin) (Hong in sod., 2005). Proizvodnjo bakteriocinov, ki inhibirajo nekatere potencialno patogene enterobakterije, so dokazali tudi pri vampnem probiotičnem kandidatu *Pseudobutyrvibrio xylanovorans* (Čepeljnik in sod., 2003).

Spodbujanje različnih komponent imunskega sistema oziroma imunomodulacija velja za pomemben, a zelo kompleksen mehanizem probiotičnega delovanja. Vloga probiotikov pri slednjem naj bi bila dvojna – po eni strani naj bi spodbujali nekatere obrambne mehanizme naravne in pridobljene imunosti, po drugi strani pa naj bi bili pomembni tudi pri zaviranju prekomernega vnetnega odziva, ki je pogosto povezan z različnimi alergijami in t.i. avtoimunskimi boleznimi (Chronova bolezen, diabetes tipa 1, multipla skleroza) (Maldonado Galdeano in sod., 2007; Rook in Brunet, 2005). Probiotični mikroorganizmi lahko vplivajo tako na lokalni, kot na sistemski imunski odziv. Eden od pomembnejših načinov delovanja na lokalni ravni je preko spodbujanja nastajanja celic, ki proizvajajo sluznična protitelesa, IgA. Nekateri probiotične bakterije delujejo kot adjuvansi, torej spodbujajo intenziteto sluzničnega in sistema imunskega odziva ob stiku s patogeni. Analiza citokinskih profilov je pokazala, da nekatere mlečnokislinske bakterije pomembno spodbujajo proizvodnjo tumor nekrotizirajočega faktorja  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in regulatornega citokina interleukina-10 (IL-10) (Maldonado Galdeano in sod., 2007).

Preostali mehanizmi, ki lahko pripomorejo k ugodnim učinkom probiotikov vključujejo predvsem aktivnost različnih mikrobnih encimov, ki se odraža na različnih nivojih. Slednji, predvsem pri rastlinojedih živalih, pomembno prispevajo k učinkovitejši razgradnji in izkoriščanju krme. Pri tem so ključnega pomena predvsem celulaze, ksilanaze in nekateri drugi fibrolitični encimi, ki jih običajno posedujejo vampni mikrobi (Čepeljnik in sod., 2003; Liu in sod., 2005). Drugi mehanizem, ki vključuje aktivnost mikrobnih encimov je pretvarjanje genotoksičnih spojin v nereaktivne produkte (detoksikacija), posledica česar je zmanjšano tveganje za, na primer, rakava obolenja prebavil. Poleg biokonverzije, predlagani mehanizmi zmanjševanja genotoksičnosti ksenobiotikov predpostavljajo še neke vrste imobilizacijo preko vezave na strukturne komponente mikrobnih celic (peptidoglikan, polisaharide) ter reagiranje z bakterijskimi metaboliti (Cenci in sod., 2008; Cenci in sod., 2005; Orrhage in sod., 2002). Učinki zmanjšanja genotoksičnosti različnih mutagenov so opisani tako pri nekaterih predstavnikih mlečnokislinskih bakterij kot tudi pri nekaterih probiotičnih sevih iz rodu *Bacillus* (Cenci in sod., 2008). Protirakavi učinki probiotičnih sevov pa niso povezani le z razgradnjo ali nevtralizacijo kancerogenih spojin, temveč tudi s proizvodnjo nekaterih zaščitnih molekul, kot sta butirat in konjugirana linolna kislina (CLA) (Barcenilla in sod., 2000; Kritchevsky in sod., 2000).

Eden od zanimivejših mehanizmov, povezanih z encimatskim delovanjem mikroorganizmov je tudi razgradnja toksinov ali receptorjev, na katere se ti vežejo. Tako na primer ugodne učinke kvasovke *Saccharomyces boulardii* ob zdravljenju okužb s patogenom *Clostridium difficile* povezujejo z aktivno proteolitično razgradnjo molekul toksina A ter receptorjev za ta toksin na celicah črevesnega epitela (Castagliuolo in sod., 1996).

## UČINKI PROBIOTIKOV

V splošnem velja, da so učinki specifični za sev probiotičnega mikroorganizma, odvisni pa so tudi od vrste, starosti in zdravstvenega oziroma imunskega stanja gostitelja (Casey in sod., 2007). Prav specifičnost pogojev, ki vplivajo na delovanje probiotičnih pripravkov je

najverjetneje tudi razlog za neenotnost rezultatov, pridobljenih v različnih študijah. Slednje najpogosteje poročajo o pozitivnih učinkih aplikacije probiotikov takoj po rojstvu živali, po antibiotičnem zdravljenju, ob okužbah z enteričnimi patogeni ter v stresnih obdobjih. Splošne učinki, ki naj bi jih imeli probiotiki na pitovne živali so: povečana odpornost na infekcijske bolezni ter posledično manjša pogostost poginov, hitrejša rast, ugodnejša konverzija krme, izboljšana prebava in absorpcija hranil, večja produktivnost ter izboljšana kakovost mleka in jajc. Študije o učinkih probiotikov na živalih so najpogosteje osredotočene na prašiče, prežvekovalce in perutnino, zanimivi pa so tudi izsledki uporabe probiotičnih pripravkov v akvakulturi. V nadaljevanju so povzete ugotovitve nekaterih novejših raziskav, ki vključujejo te kategorije.

### **Prašiči**

Driske, ki jih povzročajo patogene bakterije, predstavljajo pomemben vzrok smrti pri odstavljenih pujskih. Probiotiki so se v več študijah pokazali kot nekoliko manj učinkovita, a kljub vsemu potencialno uporabna alternativa nutritivni antibiotični profilaksi ter dobrodošla pomoč pri zdravljenju. Casey in sod. (2007) so na primer pokazali, da 30-dnevno uživanje mešanice petih sevov mlečnokislinskih bakterij (dva seva vrste *L. murinus*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *L. pentosus*, *P. pentosaceus*) bistveno izboljša izid okužbe z bakterijo *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium), enemu ključnih povzročiteljev drisk pri prašičih. Podobna študija (Schroeder in sod., 2006) poroča tudi o učinkovitosti probiotičnega seva *E. coli* Nissle 1917 pri preprečevanju in lajšanju simptomov driske, kot posledice okužbe z enterotoksigenimi sevi *E. coli* (ETEC). Zaščitna vloga probiotikov pri okužbi z ETEC naj bi bila povezana z različnimi možnimi mehanizmi, od vpliva na adhezijo patogena, ohranjanje integritete tesnih stikov med celicami epitela, povečano izločanje mucina in nekatere druge (Lalles in sod., 2007). O zmanjšani pojavnosti drisk po odstavitvi poročajo tudi ob uporabi t.i. neavtohtonih probiotičnih sevov *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in *Bacillus cereus* var. Toyi. Študija, ki so jo naredili Siggers in sod. (2008) kaže na možnost učinkovitega preprečevanja atrofije sluznice in lajšanju simptomov nekrotizirajočega enterokolitisa (močnega vnetja črevesne sluznice) pri prezgodaj rojenih pujskih, če so ti krmljeni s probiotično mešanico mlečnokislinskih bakterij rodov *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*.

### **Prežvekovalci**

Mnoge študije kažejo pozitivne učinke kvasovke *S. cerevisiae* na produktivnost prežvekovalcev. Med slednjimi so najpomembnejši: (1) ugoden vpliv na 'dozorevanje' vampne mikrobne združbe pri teletih, (2) stabilizacija vampnega pH ter (3) povečanje razgradnje vlaknin (Chaucheyras-Durand, 2008).

Galvao in sod.(2005) na primer poročajo o ugodnem učinku *S. cerevisiae* na hitrost rasti in zdravje takoj ob rojstvu odstavljenih telet, ki so jih krmili z žiti. O stabilizaciji vampnega pH ter s tem povezanim učinkom preprečevanja pojava vampne acidoze ob dodajanju živih kvasovk visoko koncentrirani krmi poročajo tako pri ovcah (Chaucheyras-Durand in Fonty, 2006), kot pri kravah (Williams in sod, 1991; Bach in sod., 2007). Učinek povezujejo z različnimi možnimi mehanizmi, od interakcij kvasovke z bakterijami, ki metabolizirajo laktat, do kompeticije pri fermentaciji sladkorjev in spodbujanju amilolitičnih praživali (Chaucheyras-Durand, 2008).

Zelvyte in sod. (2006) poročajo o izboljšani prebavljivosti krme in večji mlečnosti, če so krave 58 dni uživale probiotični izdelek LEVUCCELL SC (vsebuje *S. cerevisiae*). Slednje povezujejo s povečanjem števila celulolitičnih mikroorganizmov in izboljšano fermentacijo sladkorjev. Poleg kvasovk preizkušajo tudi morebitne ugodne učinke nekaterih bakterij. Poskus, v katerem so kravam molznicam (2 tedna pred telitvijo in 5 tednov po njej) v vamp dodajali

pripravek z bakterijskim probiotičnim kandidatom *Prevotella bryantii* 25A, je pokazal povečano proizvodnjo hlapnih maščobnih kislin v vampu ter večjo vsebnost maščob v mleku (Chiquette in sod., 2008). Karitas in sod. (2006) poročajo o večji mlečnosti in izboljšani kakovosti mleka ter zmanjšanem poginu jagenjčkov zaradi driske ob krmljenju ovc s probiotičnim pripravkom BioPlus 2B (vsebuje spore bakterij *B. licheniformis* in *B. subtilis*).

Preglednica 1. Izvor in učinki nekaterih probiotikov na izbrane vrste vodnih živali (prirejeno po Brunt in Austin, 2008; Kesarcodi-Watson, 2007)

Table 1. Sources and effects of selected probiotics on aquatic host species (modified from Brunt and Austen, 2008; Kesarcodi-Watson, 2007)

Probiotični mikroorganizem	Izvor probiotičnega mikroorganizma	Tarčni gostitelj	Učinek probiotičnega mikroorganizma na gostitelja
<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Carnobacterium</i> spp., <i>Micrococcus luteus</i>	Prebavila <i>O. mykiss</i>	Šarenka ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Omejevanje furunkuloze (infekcijske bolezni, ki jo povzroča bakterija <i>Aeromonas salmonicida</i> ).
<i>Aeromonas media</i> (A199)	Neznan	Ostrige ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Zmanjšana smrtnost ob okužbi z <i>Vibrio tubiashii</i> .
<i>Carnobacterium</i> spp.	Prebavila <i>S. salar</i> L.	Atlantski losos ( <i>Salmo salar</i> L.)	Ob sočasni inokulaciji zmanjšanje obsega bolezni, ki jih povzročajo <i>A. salmonicida</i> , <i>V. ordalii</i> in <i>Y. ruckeri</i> .
<i>Enterococcus faecium</i> (SF68)	Neznan	Jegulja ( <i>Anguilla anguilla</i> )	Omejevanje edwardsielloze (infekcijske bolezni, ki jo povzroča bakterija <i>Edwardsiella tarda</i> )
<i>Lactobacillus fructivorans</i> (AS17B) <sup>1</sup> , <i>Lactobacillus plantarum</i> (906) <sup>2</sup>	<sup>1</sup> Prebavila <i>S. auratu</i> , <sup>2</sup> človeški feces	Zlata orada ( <i>Sparus auratu</i> )	Zmanjšana smrtnost pri larvah starih 39–66 dni.
<i>Lactobacillus</i> spp. in <i>Carnobacterium</i> spp.	<i>B. plicatilis</i>	Larve romba ( <i>Scophthalmus rombus</i> )	Zmanjšana smrtnost ob infekciji z <i>Vibrio</i> spp.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>L. niloticus</i>	Šarenka ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Zmanjšana smrtnost ob infekciji z <i>Vibrio anguillarum</i> .
<i>Roseobacter</i> spp.	Ribogojnica z larvami <i>S. rombus</i>	Romb ( <i>Scophthalmus rombus</i> )	"In vitro" antagonizem proti <i>V. anguillarum</i> .
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Komercialna gojilnica morskih rakov	Atlantski losos ( <i>Salmo salar</i> L.)	Učinkovito omejevanje bolezni, ki jih povzročajo <i>A. salmonicida</i> , <i>V. anguillarum</i> in <i>V. ordalii</i> ,

## Perutnina

Zmanjšana smrtnost zaradi okužb z enteričnimi patogeni, izboljšana konverzija krme in hitrejša rast so najpogosteje opisani učinki dodajanja probiotikov v krmo perutnine. Vicente in sod. (2007) so vse omenjene učinke opazili pri brojlerjih ob uporabi probiotičnega pripravka na

osnovi več sevov rodu *Lactobacillus*. Do podobnih rezultatov so ob uporabi tekočega probiotičnega pripravka s sedmimi, iz piščančjega prebavnega trakta izoliranimi sevi rodu *Lactobacillus*, prišli tudi Timmerman in sod. (2006). Nekatere študije s probiotičnimi pripravki, ki vsebujejo endospore nekaterih sevov *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* prav tako kažejo na pozitivne učinke v smislu izboljšane konverzije krme oziroma preprečevanja kolonizacije in perzistence nekaterih enteričnih patogenov (Hong in sod., 2005; Midilli in sod., 2008).

### Vodni organizmi

Uporaba probiotikov se je uveljavila tudi na področju gojenja vodnih živali (predvsem rib, rakov in školjk), kjer infekcijske bolezni predstavljajo poglaviti vzrok finančnih izgub. Probiotični pripravki, ki se uporabljajo v akvakulturi poleg mlečnokislinskih bakterij in endospor rodu *Bacillus*, vsebujejo tudi bakterije iz rodov *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Carnobacterium* in nekatere druge (Brunt in Austin, 2008; Kesarcodi-Watson, 2008). Preglednica 1 prikazuje izvor in učinke nekaterih probiotičnih mikroorganizmov na gostitelje.

## PROBIOTIČNI KRMNI DODATKI NA TRŽIŠČU

Registracija probiotičnih proizvodov za uporabo v živalski prehrani je v Evropi podvržena strogi Regulativi (EC) No. 1831/2003, ki ureja celotno področje krmnih dodatkov (avtorizacijo, uporabo, označevanje in pakiranje). Vsi odobreni krmni dodatki morajo v splošnem zadoščati trem pogojem: a) ne smejo biti škodljivi za zdravje živali in ljudi ter okolju, (b) ne smejo biti predstavljeni zavajajoče za kupca in (c) ne smejo škodljivo vplivati na značilne lastnosti živalskih proizvodov ali zavajati kupca glede vpliva na omenjene lastnosti. Registracija probiotičnih krmnih pripravkov v Evropi je pogojena z natančnim testiranjem varnosti in učinkovitosti le teh, kar pa za proizvajalce predstavlja precejšnje finančno breme (Anadon, 2006a; Anadon in sod., 2006b). Na tržišču so se zato, do pred kratkim, poleg registriranih, vedno znova pojavljali tudi nepreverjeni proizvodi brez ustreznih dovoljenj. Da bi izboljšala prepoznavnost svojih proizvodov in pripomogla k hitrejšemu izključevanju pripravkov, ki ne ustrezajo evropskim standardom, se je večina pomembnejših evropskih podjetij za proizvodnjo in distribucijo probiotičnih krmnih pripravkov že leta 1999 povezala v t.i. Evropsko združenje za probiotike (EPA). V letu 2001 je EPA na trgu prepoznala 21 registriranih probiotičnih proizvodov, namenjenih živalim (Ziggers, 2008). Nekatere med njimi prikazuje Preglednica 2.

## PROBIOTIKI PRIHODNOSTI?

Razvoj tehnologije genskega inženirstva je prinesel na področje probiotikov nove možnosti za izboljšave na različnih ravneh. Kot učinkovitejša alternativa prilagajanja probiotičnih sevov na razmere med proizvodnjo in prehodom prebavil s predhodno izpostavitvijo blagim oblikam stresa (nespecifična indukcija genov tolerančnega odziva), se je pojavila možnost kloniranja genov odpornosti oz. tolerance na različne oblike stresa, iz drugih mikroorganizmov (Sleator in Hill, 2008). Tako so na primer s kloniranjem gena *betL*, ki kodira transporter za kompatibilni topljenec betain pri bakteriji *Listeria monocytogenes*, dosegli povečanje tolerance probiotičnega seva *L. salivarius* UCC118 na soli ter preživetje pri nizkih temperaturah (Sheehan in sod., 2006). Kloniranje istega gena v sev *B. breve* UCC2003, pa se je odrazilo v obliki izboljšane odpornosti proti želodčnemu soku (Sheehan in sod., 2007). Učinek povečane odpornosti na želodčno kislino so dosegli tudi s prenosom genov za sintezo trehaloze (kompatibilni topljenec *E. coli*) *ostAB* v probiotični sev *L. lactis*, poleg tega pa je omenjeni rekombinantni sev kazal tudi boljšo preživljivost ob izpostavitvi žolčnim solem in pogojem med postopkom liofilizacije (Termont in sod., 2006).



Preglednica 2. Nekateri v Evropi registrirani probiotični pripravki in skupine živali, za katere je bil dokazan njihov učinek in varnost (prirejeno po Hong in sod., 2005 ; EFSA, 2004a; 2004b; 2006a; 2005a; 2005b; 2006b; 2007a; 2007b; 2007c; 2008a; 2008b; 2008 c)

Table 2. Selected commercial probiotic products and groups of animals for which beneficial effects and safety of these products were shown (modified from Hong *et al.*, 2005; EFSA, 2004a; 2004b; 2006a; 2005a; 2005b; 2006b; 2007a; 2007b; 2007c; 2008a; 2008b; 2008 c)

Blagovna znamka	Probiotični mikroorganizem	Tarčni gostitelji
Toyocerin <sup>®</sup>	Endospore <i>B. cereus</i> var Toyoi (NCIMB 40112/CNCM I -1012)	Govedo (pitanci, teleta), kokoši (nesnice, brojlerji), purani, kunci, prašiči (pitanci, svinje)
Bioplus 2B <sup>®</sup>	Endospore <i>B. licheniformis</i> (DSM5749) in <i>B. subtilis</i> (DSM5750)	Prašiči (pujski po odstavitvi, svinje, pitanci), kokoši (brojlerji), purani, govedo (teleta)
Bactocell <sup>®</sup> / Fermaid <sup>®</sup>	<i>P. acidilactici</i> (CNCM MA 18/5 M)	Kokoši (brojlerji), prašiči (pitanci)
Biosaf <sup>®</sup> SC 47	<i>S. cerevisiae</i> (NCYC Sc47)	Govedo (pitanci, krave molznice), kunci, prašiči (pujski po odstavitvi, svinje), konji, ovce (jagenjčki, molznice), koze (molznice)
Biosprint <sup>®</sup>	<i>S. cerevisiae</i> (BCCM/MUCL39885)	Prašiči (pitanci), govedo (pitanci, krave molznice)
Levucell <sup>®</sup> SC 20/ SC 10ME	<i>S. cerevisiae</i> (CNCM I-1077)	Govedo (pitanci, krave molznice), koze, ovce (molznice, jagenjčki)
Yea Sacc <sup>®</sup>	<i>S. cerevisiae</i> (CBS 493.94)	Govedo (pitanci, krave molznice, teleta), konji
Oralin <sup>®</sup>	<i>E. faecium</i> (DSM 10663 / NCIMB 10415)	Govedo (teleta), prašiči (pujski po odstavitvi), perutnina (brojlerji, purani), psi
Bonvital <sup>®</sup>	<i>E. faecium</i> (DSM 7134)	Prašiči (pujski po odstavitvi, pitanci, svinje), perutnina (brojlerji)
Fecinor <sup>®</sup>	<i>E. faecium</i> (CECT 4515)	Prašiči (pujski po odstavitvi), govedo (teleta), perutnina (brojlerji)
Lactiferm <sup>®</sup>	<i>E. faecium</i> (NCIMB 11181 (M74))	Govedo (teleta), prašiči (pujski po odstavitvi), perutnina (brojlerji)
Biacton <sup>®</sup>	<i>L. farciminis</i> (CNCM MA 67/4R)	Prašiči (pujski po odstavitvi), purani, kokoši (brojlerji, nesnice)

Poleg novih možnosti za izboljšanje tolerance na stresne razmere, so tehnologije genskega inženirstva skupaj z vse boljšim poznavanjem mehanizmov delovanja patogenov omogočile tudi pripravo sevov, ki specifično prepoznavajo patogene oziroma njihove toksine. T.i. strategija interference vezave na receptorje temeljijo na molekulskem posnemanju gostiteljskih tarč za patogene (toksine), ki jih izražajo probiotični sevi. Omenjene pristope so že uspešno preizkusili za lajšanje nekaterih enteričnih okužb. Eden takšnih konstruktov, rekombinantni sev *E. coli*, ki je na površini izražal himerno molekulo lipopolisaharida (LPS) z receptorjem za šiga-toksin (Stx), je izjemno učinkovito nevtraliziral omenjeni toksin (1 mg rekombinantne bakterije je vezal več kot 100 µg molekul Stx1 in Stx2) (Paton in sod., 2000). Podobno so pripravili tudi rekombinantni probiotični sev *E. coli* CWG308, ki nevtralizira toksin Stx2e, ključni virulenčni

dejavnik povzročitelja edemske bolezni (pomemben vzrok smrti pri odstavljenih pujskih) ter probiotična seva s potencialom za nevrofizikalno temperaturno občutljivega toksina (LT) enterotoksigena *E. coli* (ETEC) in toksina kolere (Ctx) (Paton in sod., 2006). Možnost uporabe probiotikov pa se ne kaže le v terapiji, temveč tudi v preprečevanju nekaterih bolezni. Probiotiki s potencialom za usmerjeno spodbujanje imunskega sistema predstavljajo obetavno alternativo klasičnim cepivom (Sleator in Hill, 2008).

Nenavsezadnje tehnologija genskega inženirstva omogoča tudi pripravo probiotičnih sevov z izboljšanimi ali novimi lastnostmi, ki gostitelju koristijo v smislu izboljšanja razgradnje in izkoriščanja krme. Liu in sod. (2005) so tako v probiotični sev *L. reuteri* klonirali gene za razgradnjo vlaknin treh različnih vampnih mikroorganizmov (zapis za ksilanazo glive *Neocallimastix patriciarum*, zapis za beta-glukanazo bakterije *Fibrobacter succinogenes* in zapis za celulazo glive *Pyromyces rhizinflata*). Novi sevi so tako pridobili sposobnost razgradnje karboksimetil celuloze, beta-glukana ali ksilana, poleg tega pa so se še vedno učinkovito pritrjali na sluznico ter obdržali odpornost proti žolčnim solem in kislini. Rekombinantni sevi tako lahko preživijo in aktivno razgrajujejo vlaknine tudi v prebavilih monogastričnih živali.

Hitro naraščajoče znanje o funkcijah genskih lokusov ter razvoj novih orodij na področju genskega inženirstva obeta v končni fazi skoraj brezmejnne možnosti konstrukcije probiotičnih sevov s poljubnimi kombinacijami zelenih lastnosti (Lartigue, 2007), vendar pa bo prestop slednjih iz laboratorijev v prakso možen le ob ustrezni zakonodaji, podprti s pozitivnim strokovnim in javnim mnenjem.

## SUMMARY

Probiotics are defined as living micro-organisms that upon ingestion in certain numbers, exert health benefits to the host. Their use is linked to proven efficacy on the gastrointestinal microbial equilibrium as well as immunomodulation, even though the exact mechanisms of action are not yet fully elucidated. The positive effect in animals exerts not only in an improved health status, especially in young animals, but also in improved animal performance, including growth rate and feed conversion efficiency. Microorganisms that are used in animal feeds in the EU are mainly Gram-positive bacteria belonging to genera *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Streptococcus* and yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Kluyveromyces* species. While most of the species are apparently safe, certain microorganisms may exert harmful properties for animals as well as humans. Enterococci, for example, might harbour transmissible antibiotic resistance determinants, which have the potential to spread in animal and human-associated pathogenic microbial populations. The advantage of spore-forming bacteria is their natural resistance to harsh environmental conditions, which allows them to survive feed manufacturing processes as well as low pH and bile salts inside animal gastrointestinal tract. *S. cerevisiae* is most frequently used probiotic species used in ruminant nutrition, as it helps to establish primary microbial community in rumen of calves, prevent rumen acidosis by stabilizing rumen pH and improve fiber digestion by stimulating the growth and activity of cellulolytic bacteria. Probiotics are also widely used in aquaculture. Besides lactic acid bacteria and spore-forming *Bacilli*, some other genera, including *Aeromonas*, *Vibrio*, *Edwardsiella* are also in use, usually in order to prevent infective disease in fish, shellfish and shrimps.

The rules for the authorisation, use, monitoring, labeling and packaging of probiotic feed additives are set by new Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of September 2003 on additives for use in animal nutrition. Recent developments in synthetic and systems biology, coupled with bioinformatics and novel tools for genetic engineering, will soon enable the construction of 'artificial' probiotic microorganisms with

virtually any combination of properties. Whether and when these 'designer probiotics' will reach out of the labs depends on legislation as well as public opinion.

## VIRI

- Anadon, A. The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 29(2006), 41–46.
- Anadon, A./ Martinez-Larranaga, M.R./ Aranzazu Martinez, M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul. Tox. Pharm.*, 45(2006), 91–95.
- Bach, A./ Iglesias, C./ Devant, M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 136(2007), 156–163.
- Barcenilla, A./ Pryde, S.E./ Martin, J.C./ Duncan, S.H./ Stewart, C.S./ Henderson, C./ Flint, H.J. Phylogenetic relationships of butyrate producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2000), 1654–1661.
- Becquet, P. EU assessment of enterococci as feed additives. *Int. J. Food Microbiol.*, 88(2003), 247–254.
- Berezina, T.P./ Ovsyannikov, V.I. Contractile activity of gastroduodenal and ileocecal zones during stress in rabbits. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2(2001), 727–730.
- Brunt, J./ Austin, B. Probiotics: a viable method of disease control in aquaculture? *Biologist*, 55(2008), 88–93.
- Casey, P.G./ Gardiner, E.G./ Casey, G./ Bradshaw, B./ Lawlor, P.G./ Lynch, B.P./ Leonard, F.C./ Stanton, C./ Ross, R. P./ Fitzgerald, G.F./ Hill, C. A fine-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(2007), 1858–1863.
- Castagliuolo, I./ LaMont, J.T./ Nikulasson, S.T./ Pothoulakis, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits Clostridium difficile Toxin A effects in the rat ileum. *Infect. Immun.*, 64(1996), 5225–5232.
- Cenci, G./ Caldini, G./ Trotta, F./ Bosi, P. *In vitro* inhibitory activity of probiotic spore-forming bacilli against genotoxins. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(2008), 331–337.
- Cenci, G./ Caldini, G./ Trotta, F. Inhibition of DNA reactive agents by probiotic bacteria. *Recent Res. Dev. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2(2005), 102–121.
- Chaucheyras-Durand, F./ Fonty, G. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia*, 61(2006), 741–750.
- Chaucheyras-Durand, F./ Walker, N.D./ Bach, A. Effects of active dry yeasts on rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Animal feed science and Technology*, 145(2008), 5–26.
- Chiquette, J./ Allison, M.J./ Rasmussen, M.A. *Prevotella bryantii* 25A used as probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production and milk composition. *J. Dairy Sci.*, 91(2008), 3536–3543.
- Čepeljnik, T./ Lah, B./ Narat, M./ Marinšek-Logar, R. Adaptation of adhesion test using Caco-2 cells for anaerobic bacterium *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*, a probiotic candidate. *Folia microbiol.*, 52(2007), 367–373.
- Čepeljnik, T./ Zorec, M./ Kostanjšek, R./ Nekrep, F.V./ Marinšek-Logar, R. Is *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T suitable as a probiotic? An *in vitro* study. *Folia microbiol.*, 48(2003), 339–345.
- De Vuyst, L./ Leroy, F.J. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13(2007), 194–199.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of product Oralin for dogs. *The EFSA Journal*, 51(2004), 1–6.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on a request from the Commission on the safety of 'Biosprint BCCMTM/MUCL39885' for the dairy cow. *The EFSA Journal*, 26(2004), 1–6.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on a request from the Commission on the safety of "Fecinor" for chickens for fattening, for use as feed additive in accordance with Council Directive 70/524/EEC. *The EFSA Journal*, 206(2005), 1–6.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of the product Lactiferm for chickens for fattening for use as a feed additive. *The EFSA Journal*, 207(2005), 1–6.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of the product Biacton (*Lactobacillus farciminis*) for chickens for fattening, turkeys and laying hens for use as a feed additive in accordance with Council Directive 70 / 524 EEC. *The EFSA Journal*, 377(2006), 1–6.

- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on Safety and efficacy of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. Toyoi) as a feed additive for turkeys. The EFSA Journal, 549(2007), 1–11.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Additives and products or substances used in animal feed on the modification of terms of authorization of the micro-organism preparation of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* (BioPlus 2B) authorised as a feed additive in accordance with Council Directive 70\*/524/EEC. The EFSA Journal, 549(2007), 1–11.
- EFSA, Safety and efficacy of Biosaf Sc 47 (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed additive for pigs for fattening - Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. The EFSA Journal, 585(2007), 1–9.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or substances used in animal feed on the safety and efficacy of the product Bonvital, a preparation of the *Enterococcus faecium*, as a feed additive for sows in accordance with Regulation (EC) No 1831/2003. The EFSA Journal, 521(2007), 1–8.
- EFSA, Safety and efficacy of Levucell SC20/Levucell SC10ME, a preparation of *Saccharomyces cerevisiae*, as feed additive for lambs for fattening – Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. The EFSA Journal, 772(2008), 1–11.
- EFSA, Application of the extension of use of Bactocell to shrimps, Section I, public summary. April, 2008  
[http://www.efsa.eu.int/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178718013087.htm](http://www.efsa.eu.int/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178718013087.htm) (2.10.2008)
- EFSA, Summary of the YEA-SACC dossier for publication as laid down by Regulation N°1831/2003, Art. 7.3.h.  
[http://www.efsa.eu.int/cs/BlobServer/FEEDAP\\_Application/feedap\\_application\\_yea\\_sacc\\_summary.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.eu.int/cs/BlobServer/FEEDAP_Application/feedap_application_yea_sacc_summary.pdf?ssbinary=true) (2.10.2008)
- Fonty, G./ Chaucheyras-Durand, F. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia*, 61(2006), 741–750.
- Galvao, K.N./ Santos, J.E./ Coscioni, A./ Villasenor, M./ Sischo, W.M./ Berge, A.C. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reprod. Nutr. Dev.* 45(2005), 427–440.
- Garcia-Migura, L./ Liebana, E./ Jensen, L.B. Transposon characterisation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60(2007), 263–268.
- Gilmore, M.S./ Faretti, J.J. The thin line between gut commensal and pathogen. *Science*, 299(2003), 1999–2002.
- Hong, H.A./ Hong, D.L./ Cutting, S.M. The use of bacterial spore-formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(2005), 813–835.
- Karitas, S.K./ Govaris, A./ Christodoulouopoulos, G./ Burriel, A.L. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. *J. Vet. Med. Series A*, 53(2006), 170–173.
- Kesarcodi-Watson, A./ Kaspar, H./ Lategan, M.J./ Gibson, L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274(2008), 1–14.
- Khan, S.H./ Ansari, F.A. Probiotics-the friendly bacteria with market potential in global market. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 20(2007), 71–76.
- Kritchevsky, D. Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Brit. J. Nutr.*, 83(2000), 459–469.
- Lalles, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R. Weaning – a challenge to gut physiologists. *Livestock Science*, 108(2007), 82–93.
- Lartigue, C./ Glass, J.I./ Alperovich, N./ Pieper, R./ Parmar, P.P./ Hutchinson, C.A./ Smith, H.O./ Venter, C.J. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science*, 317(2007), 632–638.
- Liu, J.-R./ Yu, B./ Liu, F.-H./ Zhao, X. Expression of rumen microbial fibrolytic enzyme genes in probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2005), 6769–6775.
- Mack, D.R./ Michail, S./ Wei, S./ McDougall/ Hollingsworth, M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, 276(1999), 941–950.
- Maldonado Galdeano, C./ de Moreno de LeBlanc, A./ Vinderola, G./ Bibas Bonet, M.E./ Perdigon, G. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14(2007), 485–492.
- Marden, J.P./ Julien, C./ Monteils, V./ Auclair, E./ Monculon, R./ Bavourthe, C. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J. Dairy Sci.*, 91(2008), 3528–3535.
- Midilli, M./ Alp, M./ Kocabagl, N./ Muglal, H./ Turan, N./ Ylmaz, H./ Cakr, S. Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. *S. Afr. J. Anim Sci.*, 38(2008), 21–27.
- Nagaraja, T.G./ Titgemeyer, E.C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.*, 90(2007), E17–E38.
- Newbold, C.J. Probiotics for ruminants. *Ann. Zootech.*, 45(1996), 329–335.

- Orrhage, K. M./ Annas, A./ Nord, C.E./ Brittebo, E.D./ Rafter, J.J. Effect of lactic acid bacteria on the uptake and distribution of the food mutagen Trp-P-2 in mice. *Scand. J. Gastroenterol.*, 37(2002), 215–221.
- Orrhage, K./ Bismar, B./ Nord, C.E. Effect of supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 7(1994), 17–22.
- Paton, A.W./ Morona, R./ Paton, J.C. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat. Med.*, 6(2000), 265–270.
- Paton, A.W./ Morona, R./ Paton, J.C. Designer probiotics for prevention of enteric infections. *Nature reviews*, 4(2006), 193–200.
- Rook, G.A.W./ Brunet, L.R. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005, 54(2004), 317–320.
- Saito, T. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *J. Anim. Sci.*, 75(2003), 1–13.
- Schroeder, B./ Duncker, S./ Barth, S./ Bauerfeind, R./ Gruber, A.D./ Deppenmeier, S./ Breves, G. Preventive effects of the probiotic *Escherichia coli* strain nissle 1917 on acute secretory diarrhea in a pig model of intestinal infection. *Digestive diseases and sciences*, 51(2006), 724–731.
- Sheehan, V./ Sleator, R.D./ Fitzgerald, G./ Hill, C. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology*, 153(2007), 3563–3571.
- Sheehan, V.M./ Sleator, R.D./ Fitzgerald, G.F./ Hill, C. Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Envir. Microbiol.*, 72(2006), 2170–2177.
- Siggers, R.H./ Siggers, J./ Boye, M./ Thymann, T./ Molbak, L./ Leser, T./ Jensen, B.B./ Sangild, P.T. Early administration of probiotics alters bacterial colonization and limits diet-induced gut dysfunction and severity of necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *J. Nutr.*, 138(2008), 1437–1444.
- Simon, O. Microorganisms as feed additives-probiotics. *Adv. Pork Prod.*, 16(2005), 161–167.
- Sleator, R.D./ Hill, C. New frontiers in probiotic research. *Lett. Appl. Microbiol.*, 46(2008), 143–147.
- Tannock, G.W. Probiotics and Prebiotics: Scientific aspects-book review. *Food Res. Internat.*, 39(2006), 831–832.
- Tannock, G.W. Probiotics: time for a Dose of Realism. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 4(2003), 33–42.
- Termont, S./ Vandenbroucke, K./ Iserentant, D./ Neiryneck, S./ Steidler, L./ Remaut, E./ Rottiers, P. Intracellular accumulation of trehalose protects *Lactococcus lactis* from freeze-drying damage and bile toxicity and increases gastric acid resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2006), 7694–7700.
- Timmerman, H.M./ Veldman, A./ van den Elsen, E./ Rombouts, F.M./ Beynen, A.C. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry science*, 85(2006), 1383–1388.
- Vicente, J.L./ Aviña, L./ Torres-Rodriguez, A./ Hargis, B./ Tellez, G. Effect of a *Lactobacillus* spp.-based probiotic culture product on broiler chicks performance under commercial conditions. *Int. J. Poultry Sci.*, 6(2007), 154–156.
- Williams, P.E./ Tait, C.A./ Innes, G.M./ Newbold, C.J. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.*, 69(1991), 3016–3026.
- Zelvyte, R./ Monkeviciene, I./ Balsyte, J./ Sederevicius, A./ Laugalis, J./ Oberauskas, V. The effect of probiotic LEVUCCELL SC on the activity of fermentative processes in the rumen of dairy cows and their productivity. *Veterinarija ir zootechnika*, 36(2006), 91–96.
- Ziggers, D. Probiotics get more structure. *Feed Tech (Nutrition)*, 5(2008), 24–25.