השפעת מתן תוסף פרוביוטי על תוצרי תסיסה בכרס, קצב גדילה, מטבוליטים ובריאות בגדיים עד גיל שלושה חודשים

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת תואר מוסמך

מאת

טל קופר

כסלו תשס״ה, דצמבר 2005 רחובות

עבודה זו נעשתה בהנחייתם של:

דר׳ מבג׳יש סמיר
המחלקה למדעי בעלי חיים, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים.

דר׳ שמאי אבי
המכון לחקר בעלי חיים, מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני.

תודתי נתונה ל:

דר' סמיר מבג'יש ודר' אבי שמאי
על הדרכתם המסורה, ודאגתם המתמדת שסייעה לי בכל שלבי המחקר.

ליונתן פוירמן,
על ההדרכה הסבלנית.

לשאול זמבל,
על ההדרכה והעזרה הטכנית.

לקריס סבסטיאן,
על העזרה בזמן הרצת הניסויים בדיר.

לפז שפירא,
על החברות והתמיכה בכל עת.

לחברת אש תוספים
שסיפקה את מוצרי Fastrack® לכל אורך הניסוי.

לשי בעלי,להוריי ולמשפחתי שתמכו בי לאורך כל הדרך.

תוכן עניינים

1.מבוא **7**

1.1. מערכת העיכול של מעלי הגירה – התפתחות, אנטומיה ופיסיולוגיה **7**
1.1.1. התפתחות 7
1.1.2. אנטומיה 7
1.1.3. פיסיולוגיה 7
1.1.4. הסביבה המיקרוביאלית בכרס 8
1.1.5. יונקים 8
1.2. יישומים ראשונים בפרוביוטיקה **9**
1.2.1. יישומים ראשונים בפרוביוטיקה 9
1.2.2. פרוביוטיקה ומעלי-גירה 9
1.3. פילוגנזה של חיידקים פרוביוטיים **10**
1.3.1. הקדמה 10
1.3.2. BIFIDOBACTERIUM 10
1.3.3. LACTOBACILLUS 11
1.3.4. ENTEROCOCCUS 12
1.4. פרוביוטיקה ומניעת גורמי מחלה **14**
1.5. אוכלוסיית המיקרופלורה בצינור העיכול **16**
1.5.1. גורמים משפיעים 16
1.5.2. שינוי הרכב האוכלוסייה 17
1.6. השפעות DFM במע"ג **17**
1.6.1. השפעות DFM במע"ג לפני גמילה 17
1.6.2. השפעת DFM על תפוקת חלב והרכבו 18
1.6.3. השפעת הרכב המנה על השפעות DFM 19
1.6.4. השפעת DFM על מערכת החיסון 19
1.6.5. השפעת DFM על תסיסה בכרס 21
1.7. סיכום השפעות אפשריות על מעלי-גירה. **22**
1.8. מטרות המחקר **23**

2.חומרים ושיטות **24**

2.1. חומרים ותמיסות **24**
2.2. חלק א' **24**
2.2.1. מהלך הניסוי 24
2.2.2. בדיקת השתנן בפלסמה 25
2.2.3. בדיקת חש"ן במיץ כרס 25
2.2.4. בדיקת אמוניה במיץ כרס 25
2.2.5. בדיקת pH במיץ כרס 26
2.3. תאים: **26**
2.3.1. בידוד חיידקים ממיץ כרס וצואה 26
2.3.2. הפקת DNA 26
2.3.3. קביעה כמותית של DNA 27
2.4. REAL TIME RT-PCR **27**
2.5. חלק ב' **28**
2.5.1. מהלך הניסוי 28
2.6. חלק ג' **30**
2.6.1. מהלך הניסוי 30

3.תוצאות **31**

3.1. חלק א' **31**
3.1.1. pH 31
3.1.2. שתנן בפלסמה 31
3.1.3. אמוניה במיץ כרס 32
3.1.4. חומצות שומן נדיפות במיץ כרס 33
3.1.5. Real Time RT-PCR 36
3.2. חלק ב' **37**
3.2.1. פרוליפרציית לימפוציטים 37
3.2.2. צריכת מזון מרוכז 38
3.2.3. גדילה ומצב בריאותי 38
3.3. חלק ג' **40**
3.3.1. מדדים בפלסמה 40
3.3.2. אמוניה במיץ כרס 43
3.3.3. pH במיץ כרס. 44
3.3.4. צריכת מזון 44
3.3.5. גדילה (משקל) 45

4.דיון **47**

4.1. חלק א' **47**
4.2. חלק ב' **50**
4.3. חלק ג' **52**

5.מסקנות **54**

6.מקורות: **55**

7.ABSTRACT **60**

גרפים

גרף מספר1 - פילוגנזה של לקטובצילוס, מתוך(2002) .Morotomi et al 12
גרף מספר2 - פילוגנזה של אנטרוקוקוס מתוך .(2000) .Han Goh et al..... 14
גרף מספר3 - השפעת תוסף פרוביוטי על מדד החומציות בכרס 31
גרף מספר4 - השפעת תוסף פרוביוטי על רמת השתנן בפלסמה..... 32
גרף מספר5 - השפעת תוסף פרוביוטי על רמת האמוניה במיץ כרס..... 32
גרף מספר6 - השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה אצטית במיץ כרס 33
גרף מספר7 - השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה פרופיונית במיץ כרס..... 34
גרף מספר8 - השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה בוטירית במיץ כרס 35
גרף מספר9 - השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה ואלרית במיץ כרס..... 35
גרף מספר10 - השפעת תוסף פרוביוטי על היחס חומצה אצטית /פרופיונית במיץ כרס 35
גרף מספר11 - העשרת E.faecium ו- L.acidophilus במיץ כרס 36
גרף מספר12 - העשרת E.faecium בצואה..... 37
גרף מספר13 - השפעת אנטיגן concanavalin A על חלוקת תאי לימפוציטים 38
גרף מספר14 – צריכת מזון מרוכז על ידי 2 קבוצות הגדיים בגיל 12-6 שבועות..... 38
גרף מספר15 – משקל גדיות בשתי קבוצות הטיפול עד גיל 16 שבועות..... 39
גרף מספר16 – משקל גדיים בשתי קבוצות הטיפול עד גיל 16 שבועות..... 39
גרף מספר17 – השפעת הטיפול על רמת האלבומין בפלסמה 40
גרף מספר18 – השפעת הטיפול על רמת AST בפלסמה 41
גרף מספר19 – השפעת הטיפול על רמת β- hydroxybutirate בפלסמה..... 42
גרף מספר20 – השפעת הטיפול על רמת הגלוקוז בפלסמה 42
גרף מספר21 – השפעת הטיפול על רמת האוריאה בפלסמה 43
גרף מספר22 – השפעת הטיפול על רמת האמוניה במיץ כרס 43
גרף מספר23 – השפעת הטיפול על מדד החומציות בכרס..... 44
גרף מספר24 – צריכת מזון גס (hey) ומרוכז (.conc)..... 45
גרף מספר25 – יחס שחת :מזון מרוכז במנת הגדיים בגיל 13-3 שבועות 45
גרף מספר26 – משקלי שתי קבוצות הטיפול עד גיל 15 שבועות..... 46

1. מבוא

1.1. מערכת העיכול של מעלי הגירה – התפתחות, אנטומיה ופיסיולוגיה

1.1.1. התפתחות

ייחודיות בעלי החיים הצמחוניים היא יכולת הפקת אנרגיה ממקור צמחי, וזאת כתלות במיקרואורגניזמים החיים עמם בסימביוזה באתרים שונים במערכת העיכול שלהם. שתי קבוצות של בעלי חיים צמחוניים התפתחו במהלך האבולוציה: בקבוצה הראשונה מתבצעת התסיסה המיקרוביאלית במערכת העיכול הקדמית, ובשנייה מתבצעת התסיסה המיקרוביאלית במערכת העיכול האחורית. התסיסה עצמה נובעת מפעילות בקטריות, שמרים ופרוטוזואה החיים בסימביוזה ובהתאמה למיקרוסיסטמה שבה הם חיים.

מעלי גירה הם מן הקבוצה הראשונה ולהם "קיבה" בת 4 מדורים (כרס, קיבת הכוסות, קיבת העלעלים וקיבת המיצים) כאשר רק קיבת המיצים הינה בעלת אופי חומצי. ואילו החלק הארי של התסיסה המיקרוביאלית מתרחש בכרס (Dehority, 2002).

תסיסה פרה-גסטרית מאפשרת שלושה יתרונות תזונתיים עיקריים לבעל החיים. הראשון הוא יכולת ייצור אנרגיה ממקור צמחי כגון צלולוז ופוליסכרידים אחרים, לכן נפח החומר היבש העובר לשאר חלקי מערכת העיכול קטן באופן משמעותי . שנית – האוכלוסייה המיקרוביאלית יכולה לתעל חנקן לא חלבוני (NPN-non protein N) לגדילה, באמצעות הפיכתו לחלבון מיקרוביאלי הזמין לבעל החיים. שלישית, סינתזת ויטמינים על ידי האוכלוסייה המיקרוביאלית הופכת את בעל החיים לבלתי תלוי בהזנתו כמקור לויטמינים, מלבד ויטמינים A ו- D (Dehority, 2002).

1.1.2. אנטומיה

המזון הנכנס לקיבת הכוסות מן הושט חוזר חזרה לאזור הכרס. אפיתל קיבת הכוסות יוצר פני שטח במבנה נקבים/כוסות, בעוד שפני שטח הכרס מכוסה פפילות ואף צורתן וגודלן משתנה על פי האזורים השונים בכרס. התכווצויות מסונכרנות באזור המפגש כרס-קיבת הכוסות מסייעות בערבוב מזון "חדש", העלאת גירה, פליטת גזים וכן- העברת מזון למדור השלישי – קיבת העלעלים. פנים קיבת העלעלים בנוי קיפולים אורכיים וצפופים, כאשר החלל המועט ביניהם מתמלא בחלקיקי מעכל ובנוזלי מעכל המגיעים מכיוון קיבת הכוסות וממשיך אל עבר קיבת המיצים המתנקזת אל המעי הדק. פנים קיבת המיצים מחולק לאזור הפילורי ולאזור הפונדי (fundus) המוקף מוקוזה המכילה תאים מפרישים המייצרים פפסין וחומצה הידרוכלורית. השסתום הפילורי הממוקם בקצה קיבת המיצים שולט על מעבר המעכל למעי הדק ומשלב זה, מערכת העיכול דומה לזו של בעלי חיים חד קיבתיים. (Dehority, 2002, בונדי, 1982).

1.1.3. פיסיולוגיה

במעלי גירה, המזון המעוכל נלעס רק במידה כזו שתספיק על מנת לערבבו עם הרוק וליצור בולוסים בגודל המתאים לבליעה קלה וכך הוא מגיע לחלקה הקדמי של הכרס. לרוב, מעלי הגירה יאכלו כמות מזון גדולה זמן קצר ולאחר מכן יעלו גירה במשך זמן רב. תהליך זה כרוך בהעלאת המעכל מאזור הכרס-קיבת הכוסות אל חלל הפה דרך הושט, בליעת הנוזלים, ולעיסת המוצקים

תוך הפרשת רוק מוגברת, ולבסוף בליעה מחדש של הבולוס. לרוק תפקידים חשובים, הן בהרטבת המזון היבש להקלת בליעתו והן בטיטור החומצות המיוצרות בתהליכי התסיסה בכרס. הרוק מכיל ריכוזים גבוהים יחסית של סודיום ואשלגן בי-קרבונט לצרכי טיטור וכן- חנקן (בעיקר בצורת אוריאה), מוצין, פוספטים, מגנזיום וכלור המהווים חלק מאספקת הנוטריינטים למיקרואורגניזמים (Dehority, 2002). אספקת הנוטריינטים לגדילת המיקרואורגניזמים חשובה שכן מעלי גירה ניחנו ביכולת לנצל חנקן, גם ממקור שאינו חלבוני, באמצעות ספיגת חלבון מיקרוביאלי: המיקרואורגניזמים שבכרס מנצלים חלק מן החלבון המזוני, אנרגיה ותוצרי תסיסה נוספים. בנוסף, באפשרות המיקרואורגניזמים לנצל חנקן, שאינו חלבוני, ממקורות כדוגמת אמוניה או אוריאה לקיום והתרבות. החיידקים, זורמים במעכל לאבאומאסום, שם חלבון מיקרוביאלי זה מתפרק לפפטידים, הודות לנוכחות פפסין, ולבסוף לחומצות אמינו בודדות הנספגות למערכת הדם ומשמשות את צרכי החיה. הפירוק לחומצות אמינו בודדות חל במעי הדק וממנו הן נספגות לזרם הדם (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

1.1.4. הסביבה המיקרוביאלית בכרס

הכרס עצמה מהווה כלי קיבול לתסיסה שנפחו בפרות נע בתחום 35-100 ליטר ובצאן 3-15 ליטר. המאכסן מספק אתר אכלוס ומזון למיקרואורגניזמים, ואלו מספקים לו "שירות" עיכול מיקרוביאלי פרה-גסטרי, החיוני בעת עיכול מזון גס. אספקת חלבון קבועה וסילוק קבוע של תוצרי תסיסה (CO_2, CH_4, VFA) ושאריות מזון שומרים על תנאים אידיאליים להתפתחות אוכלוסייה מיקרוביאלית אנארובית צפופה ויציבה, הכוללת גם שמרים ופרוטוזואה (בונדי, 1982, Dehority, 2002). למרות חדירת מיליוני מיקרובים ביום מן הסביבה החיצונית לתוך הכרס, באמצעות מזון, מים ואויר, בבעל חיים בריא, מיקרוסביבת הכרס לא תזדהם. זאת כיוון שהאוכלוסייה המיקרוביאלית בכרס הורגלה לשרוד בתנאים המגבילים השוררים בה, וכל מזהם שאינו מסוגל לשרוד בתנאים אילו, ייעלם. התנאים המכריעים ביותר מבחינה זו הם אנארוביות, לחץ אוסמוטי, יכולת התרסה ותחרותיות בין המיקרואורגניזמים (Kamra, 2005).

התנאים הפיסיקליים המשפיעים ביותר על גדילה ופעילות האוכלוסיות המיקרוביאליות בכרס הם: טמפרטורה ממוצעת של 39° (38-42) הנשמרת באמצעות קיום מנגנון לויסות החום בגוף הבהמה המגביל את השפעת חום התסיסה, חומציות (pH) 6.5 (6-7) , לחץ אוסמוטי 250mOsm/Kg המגיע עד 400 mOsm/Kg לאחר האכלה. תכולת חומר יבש 10-13%, ותכולת גזים: CO_2 65% ו- CH_4 27%, שמקורם בעיקר בתסיסה המיקרוביאלית. (Dehority, 2002, בונדי, 1982).

1.1.5. יונקים

בבני בקר שטרם הגיעו לגיל גמילה מחלב, עיכול וניצול המזון נעשים על פי אותם הכללים כמו בחד-קיבתיים. החלב מגיע ישירות לתוך קיבת העלעלים דרך תעלה שהיא המשך הושט ונוצרת על ידי קיפול הרירית המרפדת את הכרס הבלתי מפותחת (בונדי, 1982). סגירת התעלה נחשבת רפלקס הקורה בשלב מוקדם כתגובה לתחילת היניקה (Dehority, 2002). התחלת צריכת מזון

מוצק מהווה זרז לשחרור הורמונים טרופים (trophic) לאתחול הפרשה, תנועתיות וספיגה. כמו כן מופיעים חלבוני מוקוזה, אנזימי עיכול ומיקרואורגניזמים. תחילה מתיישבים במעי חיידקים אנארובים פקולטטיביים ולאחר מכן מינים נוספים, כתלות בהזנה (Isolauri et al., 2001).

1.2. יישומים ראשונים בפרוביוטיקה

1.2.1. יישומים ראשונים בפרוביוטיקה

"פרוביוטיקה" החלה לראשונה להוות עניין למדענים כאשר Elie Metchnikoff (1845-1916), זוכה פרס נובל עקב גלוי ותיאור ראשון של מנגנון הפגוציטוזה, החל לגלות עניין בתהליך ההזדקנות. הוא טען בספרו The prolongation of life (1908) כי חלק מהבקטריות במעי הגס של האדם מזיקות (עקב פירוק פרוטאוליטי של חלבונים) ומהוות מקור לתוצרים רעילים (אמוניה לדוגמא) הנספגים מן המעי, חלקם אינם עוברים תהליכי דה-טוקסיפיקציה בכבד ומזיקים למערכות העצבים והדם של המאכסן, ובכך תורמים לתהליך ההזדקנות. הפיתרון של מצ'ניקוף היה רדיקלי: הסרה כירורגית של המעי הגס. פיתרון מקובל יותר היה ניסיון להחליף את הבקטריות "המזיקות" (לפחות את חלקן) בבקטריות "מיטיבות" בעלות פעילות פרוטאוליטית נמוכה. לשם כך השתמשו בבקטריות מייצרות חומצה לאקטית (LAB- Lactic Acid Bacteria) כיוון שהבחינו כי תסיסת בקטריות אילו בחלב מונעת גדילת בקטריות שאינן עמידות לחומציות, כולל המינים הפרוטאוליטים. (Krehbiel et al., 2003; Tannock 2002) . עקב פרסומיו החלה התעניינות בחיידק L. acidophilus שנמוגה באמצע שנות ה- 30 של המאה העשרים. ההתעניינות בטיפול באמצעות L. acidophilus חודשה בעקבות מלחמת העולם השנייה, כאשר אנטיביוטיקה נכנסה לשימוש שוטף. האחרונה הייתה כל כך יעילה והרסה את כל הבקטריות במעי, ההשפעה הייתה בהופעת "שלשול אנטיביוטי" ושאר תופעות לוואי קרובות באופן נרחב באוכלוסייה. מאז ועד היום פורסמו מחקרים רבים בנוגע לטיפול בבני אדם באמצעות מיקרואורגניזמים, אולם השפעת פרוביוטיקה על תגובות יצור חלב ובשר במעלי-גירה ואופן פעילות הבקטריות בכרס לא נבדק עד לאחרונה (Krehbiel et al., 2003).

1.2.2. פרוביוטיקה ומעלי-גירה

הכרס מהווה אקוסיסיטמה פתוחה שבה מזון הנצרך על ידי החיה מותסס והופך לחומצות שומן נדיפות ולביומסה מיקרוביאלית המהוות מקור אנרגיה וחלבון (בהתאמה) בעבור החיה. הזנים המיקרוביאלים שהתפתחו במהלך האבולוציה בכרס, מרכיבים יחד מערכת מורכבת של יחסי גומלין. אולם, ממשק ההזנה המודרני שמטרתו עידוד יצרנות לא תמיד עמד בקנה אחד עם דרישות המיקרופלורה בכרס. בהתאם לזאת, ניכר רצון לשפר מדדי תסיסה בכרס שיובילו לעידוד היצרנות. (Weimer, 1998).

לאחרונה הוצע שלחלק מהתוספים הפרוביוטיים יש השפעות חיוביות גם בכרס (לא רק במעי), כגון ירידה בפוטנציאל לאצידוזיס מטבולי, עליה ביעילות ניצול מזון ובתוספת משקל גוף, עליה בתפוקת החלב. התגובות כללו ירידה בגודל האזור הנתון תחת pH סב-אקוטי, עליה בריכוז פרופיונאט בכרס, עליה במספר הפרוטוזואה וירידה במספר חיידקי E. Coli בצואה. (Krehbiel et

al., 2003). מתן אוראלי של חיידקים פרוביוטים מוביל להימצאותם באופן זמני בצואה, אולם הימצאותם הופסקה במקביל להפסקת מתן החיידקים (Dunne et al., 1999; Ewaschuk et al., 2004).

באופן כללי מקובל לחשוב כי אוכלוסיות מיקרוביאליות יציבות (יחסית) לאורך זמן, זאת מאחר שקיום תגובות הומיאוסטטיות מכוונות לקיום שיווי משקל דינאמי בין האוכלוסיות המיקרוביאליות בכל זמן נתון, גם בזמן שינוי האקוסיסטמה במערכת העיכול (Tannock, 2002).

לשכתב או למחוק

1.3. פילוגנזה של חיידקים פרוביוטיים

1.3.1. הקדמה

המונח "פרוביוטי" הוגדר כ"תוסף מיקרוביאלי חי, המשפיע באופן חיובי על המאכסן ע"י שיפור מאזן המיקרו ארגניזמים (מק"א) במעי ושימש לתיאור תרביות מק"א, מיצויים מתרביות, enzyme preparations או שילובים שונים שלהם. לכן ה- U.S. FDA דרשה מיצרני מזון להשתמש במושג Direct (Fed Microbials DFM) במקום "פרוביוטי" והגדרת ה- U.S. FDA צומצמה ל"מקור של מק"א חיים הקיימים באופן טבעי". מק"א המשמשים כ- DFM למע"ג כוללים תרביות חיות של שמרים ובקטריות (Krehbiel et al., 2003). עם זאת, במחקרים רבים משתמשים במינוח LAB המכוון לבקטריות ספציפיות המייצרות חומצה לאקטית.

החיידקים הקרויים LAB הם גרם חיובים, שאינם בעלי ספורות, catalse negative, ללא ציטוכרום. בעלי עדיפות לסביבה אנארובית, אך בכל זאת סובלנים למידה מסוימת של חמצן, עמידים לחומצה ומייצרים חומצה לאקטית כתוצר סופי עיקרי של תסיסת סוכרים (Holzapfel et al., 2001).

חיידקים גרם חיוביים יוצרים 2 קווים עיקריים, האחד עם הרכב בסיסי DNA גואנין וציטוזין (G+C) פחות מ- 50 mol% הנקרא Clostridium philum ואילו השני עם הרכב בסיסי DNA גואנין וציטוזין (G+C) יותר מ- 50 mol% הנקרא Actinomycetes phylum. בקטריות LAB הטיפוסיות כגון Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc שייכות ל- Clostridium philum שבו הרכב (G+C) נמוך מ- 50 mol%. בקטריות LAB מכילות 3 קבוצות פילוגנטיות: Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus casei-Pediococcus, Leuconostoc. חוסר במקור מונופילטי ברור והקישור החזק לבקטריות LAB אחרות גורר קושי טקסונומי רב (Vaughan et al., 2002).

1.3.2. Bifidobacterium

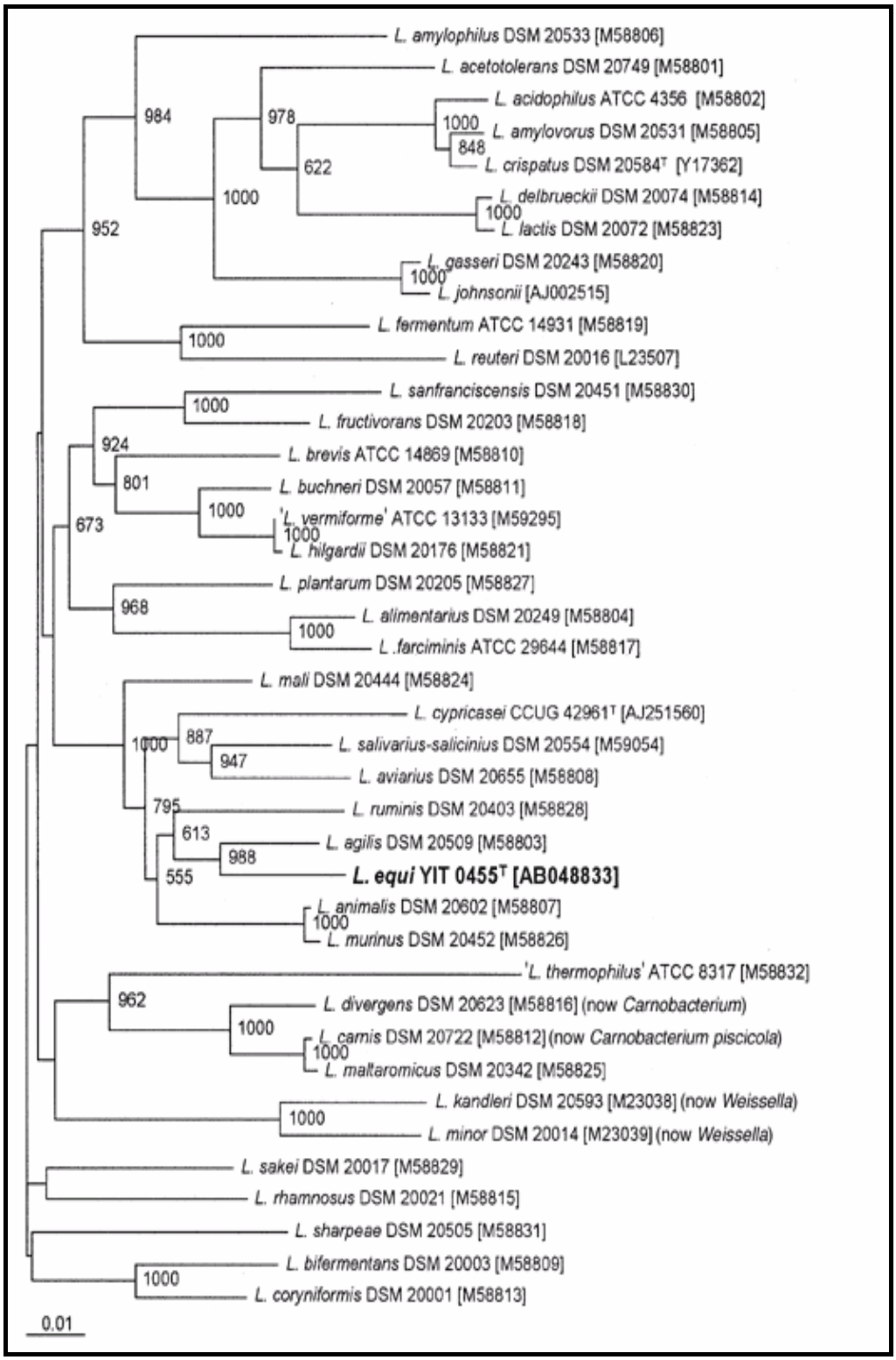
גנום זה הינו רחוק מבחינה פילוגנטית מבקטריות LAB מאחר והוא שייך טקסונומית ל- Actinomycetes phylum, אולם הוא בעל מאפיינים פנוטיפים כשל בקטריות LAB כגון ייצור חומצה, לכן, מטעמי מסורת ופרקטיות הוא נכלל כחלק מבקטריות LAB. (Vaughan et al., 2002).

הזנים בקבוצה זו הנם חיידקי גרם חיוביים נייחים, שאינם בעלי ספורות, בצורת rod. בתנאי תרבית מסוימים עשויים להראות תאים מסתעפים מבחינה מורפולוגית. חיידקים אילו הנם אנארובים אובליגטוריים, המייצרים חומצות אצטית ולאקטית בעת התססת גלוקוז (Tannock, 2002).

1.3.3. Lactobacillus

הזנים בקבוצה זו הנם בצורת rod והם גדלים היטב על גבי מצעים שהם אנארובים מוחלטים. בעת התססת גלוקוז הם מייצרים חומצה לאקטית. הם רכיבים נפוצים במוצרים 'פרוביוטים' למרות שבפועל הם אינם עולים על 1% מסך האוכלוסייה הבקטריאלית בצואת אדם.(Tannock, 2002; Roy et al., 1999; Heilig et al., 2002). ניתן למצוא את מיני ה- Lactobacillus באזורים שונים של מערכת העיכול באדם ובע"ח ואף בחומרים צמחיים כגון גרעינים ותחמיצים (Brandt & Alatossava, 2003; Roy et al., 1999) .

ניתן להתרשם מן הקשרים הפילוגנטיים שבין חיידקי משפחה זו בגרף מס' 1.



גרף מספר 1- פילוגנזה של לקטובצילוס, מתוך(2002) Morotomi et al.

1.3.4. Enterococcus

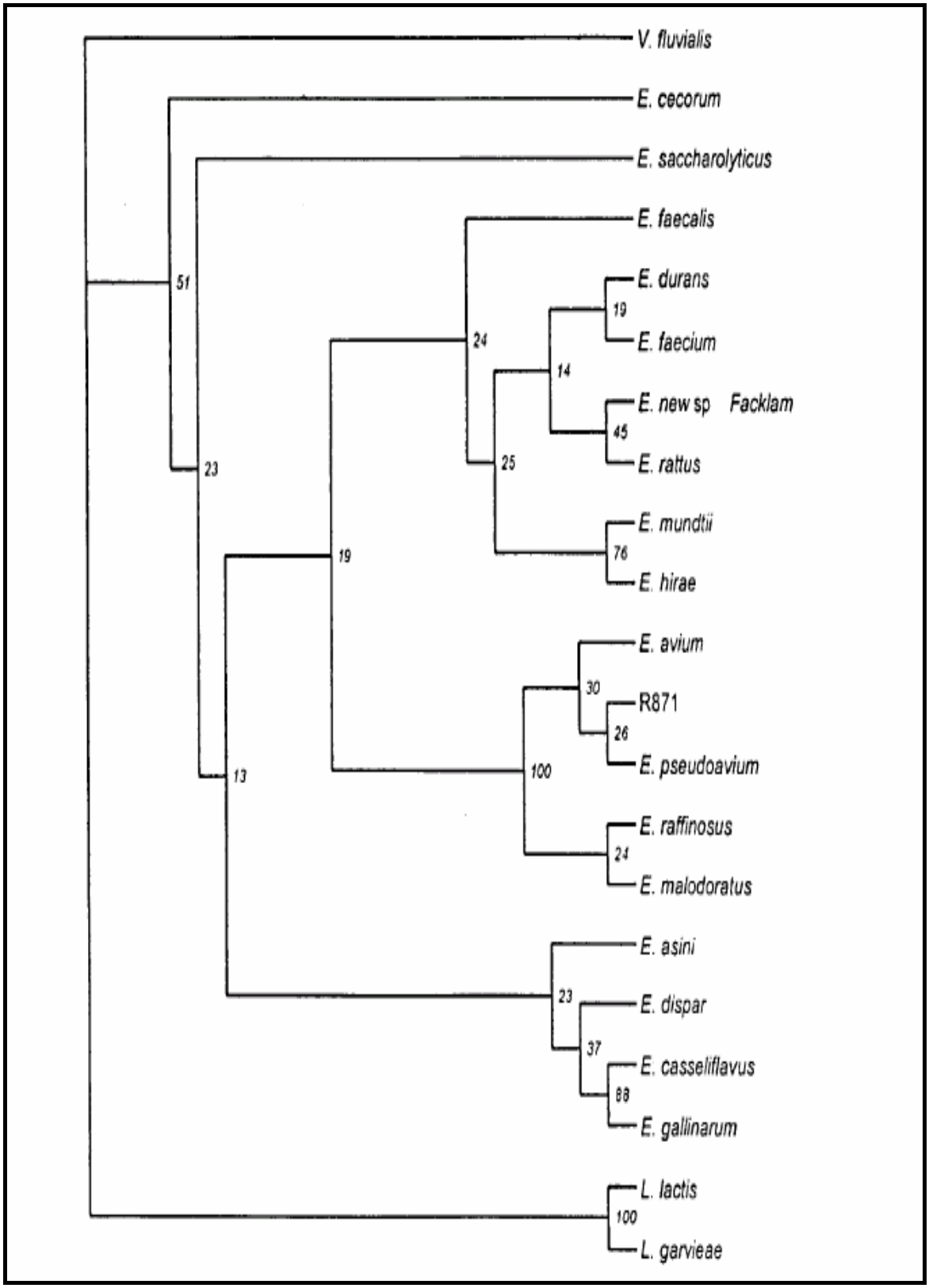
הזנים בקבוצה זו הנם חיידקי גרם חיוביים, בצורת coccus המתארגנים בצורת זוגות או שרשראות. גם קבוצה זו שייכות ל- Clostridium philum שבו הרכב (G+C) נמוך מ- 50 mol%, הם עמידים בריכוזים גבוהים יחסית של מלחים, חומצות ואף דטרגנטים מסוימים. לרוב חיים

במערכות עיכול של יונקים, אולם באמצעות הצואה עלולים להימצא גם בקרקע, בביוב ובמים. קווים מסוימים עלולים לגרום למגוון דלקות, כולל דלקות בדרכי השתן, בדם ובאנדוקרדיום. הזן E. faecium מהווה 5-16% מכלל זני האנטרוקוקוס המבודד במצב של דלקות מעיים בבני אדם.והינו גם בעל הפנוטיפיות ההטרוגנית הגדולה ביותר מכלל זני האנטרוקוקוס. ה- E. faecium ידוע ביכולותיו ל"רכוש" תכונות של עמידות למגוון רחב של גורמים אנטימיקרוביאליים, בכלל זה אנטיביוטיקה, לאחר חשיפתו אליהם (Woodford et al., 2002; Chang et al., 1997; Werner et al., 2004).

כאמור, חלק מהקווים בקבוצה זו מעורבים בדלקות אופורטיוניסיטיות, לחלק תפקיד בהתססת מזונות, וחלק מהקווים הם קווים קומנסלים החיים במערכת העיכול של האדם ובעלי חיים. מחקרים מעטים נעשו על יכולת האדהזיה ועיכוב הפתוגנים במעי של חיידק זה, למרות שמעל 60% מן המוצרים הפרוביוטים בשוק מכילים קוים של אנטרוקוקוס (Jin et al, 2000).

בשנת 2004 נבדק החיידק כבעל פוטנציאל לשמש אינוקולום בהדבקת תחמיצים, במטרה שיוכל לשמש גם כחיידק פרוביוטי שביכולתו לייצר חומצה לאקטית ובכך להעלות את חומציות התחמיץ ולעכב גדילת בקטריות המייצרות חומצה בוטירית כגון Clostridia. בקרב Enterococcus השייכים לבקטריות המייצרות חומצה לאקטית (LAB) נמצאו מינים שביכולתם להפוך לדומיננטיים בתחמיץ ובכך להעלות בו את ריכוז חומצה לאקטית ולהוריד את ה-pH הגז והרס החלבון, בנוסף ליכולתם להשפיע במערכת העיכול של מעלי-גירה לשימור מאזן המיקרואורגניזמים במעי, כולל העלמת / הפחתת מיקרואורגניזמים לא רצויים. אותו קו (EF9296), נמצא בעל תכונות של עמידות לחומצות מרה ולתרופות אנטיביוטיות מסוימות, בנוסף ליכולתו לייצר חומצה לאקטית וחומרים דמויי בקטריוצידים. כמו כן נמצא כי הוא בעל פעילות יורוליטית (urelytic) וכושר גדילה במיץ כרס. (Marciňáková et al., 2004).

ניתן להתרשם מן הקשרים הפילוגנטיים שבין חיידקי משפחה זו בגרף מס' 2.



גרף מספר 2- פילוגנזה של אנטרוקוקוס מתוך .Han Goh et al. (2000)

1.4. פרוביוטיקה ומניעת גורמי מחלה

אנטיביוטיקה משמשת באופן נרחב למניעת זיהומים הנגרמים מבקטריות פתוגניות, אך גם כמקדמת גדילה וביצועים בקרב חיות משק. אולם עם הופעת מינים פתוגנים עמידים

לאנטיביוטיקה, וחשש הציבור מפני מציאת שאריות אנטיביוטיקה במוצרי מזון שמקורם מן החי, הרצון להפחית תחלואה בקרב מע"ג במטרה למזער שימוש באנטיביוטיקה גובר (Draksler et al., 2004). השימוש בתרביות מק"א מיועד לשימוש במיוחד בקרב יונקים המצויים בהתמודדות עם סיכונים פוטנציאלים רבים בשעות חייהם הראשונות כאשר המערכת החיסונית טרם התפתחה. כמו כן מדובר גם בעגלים השרויים בתנאי עקה שונים, ואף למטרת הגברת ייצור חלב בפרות חלב ולשיפור יעילות ניצול המזון ותוספת משקלית בבקר לבשר (Krehbiel et al., 2003).

חיידקים פרוביוטים הנם "תרבית המורכבת מאוכלוסייה אחת או ממספר אוכלוסיות מעורבות, כאשר הן ניתנות לאדם או לבע"ח, ומטיבות עימו באמצעות שיפור מאפיינים / תכונות המיקרופלורה האנדוגנית". זוהי אחת ההגדרות לתיאור פעילות הפרוביוטיקה שנכתבה בשנת 1992 ע"י Havenaar et al. להגדרה זו מספר יתרונות יחסית להגדרות אחרות כיוון שאינה מגבילה פעילות פרוביוטית למיקרופלורה במעי אלא מרחיבה אותה גם לאוכלוסיות באזורים אחרים בגוף, בנוסף, על פי הגדרה זו, הפרוביוטיקה יכולה להכיל יותר ממין אחד של בקטריות (Holzapfel et al., 1998).

המיקרואורגניזמים (מק"א) המדוברים הם לרוב יצרני חומצה לאקטית כגון Lactobacillus ו – Bifidobacteria. חיידק פרוביוטי יעיל גורר השפעה חיובית על המאכסן, בטיחותי לשימוש לא פתוגני ולא רעיל. עבור רוב הקווים הפרוביוטיים המסחריים, נושא זה אינו בעייתי אולם להסגת אישורים לקווים חדשים יידרשו ככל הנראה, מידע מוכח לבטיחותם. בנוסף לכך הכרחי שמק"א אלו יכילו מספר רב של תאים חיוניים המראים פעילות מטבולית. פעילות זו כוללת תסיסה של פחמימות אנדו- ואקסוגניות ושל מקורות אנרגיה אחרים (Isolauri et al., 2004). יכולת ההישרדות וחיוניות של מק"א צריכה להיות גבוהה גם בסביבות פיזיולוגיות, כמו גם בתהליכים טכנולוגים, וכמובן חשובה היכולת להתרבות בקנה מידה תעשייתי. יש להתאים לכל קו נשא מתאים, ולמוצר הסופי צריכים להיות חיי מדף סבירים שהמינים הפרוביוטים שבו שומרים על חיוניות ופעילות מטבולית במספרים גבוהים (Collins et al., 1999; Holzapfel et al., 1998; Simmering & Blaut, 2001).

על פי Chang יש חשיבות גם ליכולתם להיצמד לתאי המאכסן, לנטרל או להחליש בקטריות פתוגניות באמצעות תחרות על אתרי התיישבות במוקוזה ותחרות על חומרי מזון (Chang et al., 2001), כמו גם להפריש חומרים המעכבים את התפתחות הפתוגנים, ומזרזים התבגרות מערכת החיסון (Isolauri et al., 2004).

הודות ליכולות אילו נוכל לצפות להפחתה בסימפטומים של lactose malabsorption תוך עליה בעמידות הטבעית כנגד מחלות מדבקות של מערכת העיכול ודיכוי גידולים, כמו כן נצפה לירידה בריכוז הכולסטרול בדם, שיפור בנעכלות וגירוי מערכת החיסון המוקוזיאלית במערכת העיכול (Collins et al., 1999). הרבה מהשפעות הפרוביוטיקה מתווכות על ידי גורמים חיסוניים, הקשורים בעיקר במאזן ציטוקינים פרו- ואנטי- דלקתיים. כלומר, ניתן להשתמש בפרוביוטיקה

ככלי להקלה על דלקות מעיים, נירמול תפקוד מוקוזת המעי וביצוע down regulation על תגובות היפר-סנסיטיביות (אלרגיות) (Isolauri et al., 2001).

ניתן להיווכח באפקטיביות המיקרופלורה במעי, המתפקדת כמחסום מפני פתוגנים, אם נלקחת בחשבון הכמות הגדולה של בקטריות הנכנסות למערכת העיכול באופן שוטף (Holzapfel et al., 1998; Dunne et al., 1999).

1.5. אוכלוסיית המיקרופלורה בצינור העיכול

1.5.1. גורמים משפיעים

אוכלוסיית המיקרופלורה בצינור העיכול כוללת תערובת דינאמית של מיקרואורגניזמים בהרכבים המשתנים גם לאורך מערכת העיכול וגם בין הלומן למוקוזה. אוכלוסיית המיקרופלורה מתפתחת עם הזמן ונקבעת על ידי מערכת יחסי הגומלין שבין גורמים גנטיים, סביבתיים, תזונה ומחלות. כתוצאה מכך, לכל פרט אוכלוסיית מיקרופלורה ייחודית (Isolauri et al., 2004).

Holzapfel et al. (1998) מחלק את הגורמים המשפיעים על הרכב האוכלוסייה המיקרוביאלית בצינור העיכול ל- 3 קבוצות: גורמים הקשורים למאכסן, גורמים מיקרוביאליים ואינטראקציות מיקרוביאליות.

ברשימת הגורמים הקשורים למאכסן, יש השפעה ל-pH , ולהפרשות כגון אימונוגלובולינים, מיצי מרה, על נשירת תאים והפרשת מוצינים. הגורמים המיקרוביאליים מתבטאים ביכולות ההיצמדות של הבקטריות, התנועתיות שלהן, גמישותן התזונתית, שרידותן במיקרו-סביבת מערכת העיכול (ספורות, קפסולות, אנזימים, רכיבים אנטי-מיקרוביאליים) ומשך מחזור החיים וקצב התרבותן. אינטראקציות מיקרוביאליות כוללות בתוכן אינטראקציות של סינרגיזם ושל אנטגוניזם או עירור. פעילות סינרגיסטית כוללת שיתוף פעולה מטבולי, הפרשת פקטורי גדילה וויטמינים, שינויים בתגובה ל- pH ולחמצן. בעוד שפעילות אנטגוניסטית כוללת הפרשת רכיבים אנטי-מיקרוביאליים, דרישות תזונתיות שונות, ושוב - שינויים בתגובה ל- pH ולחמצן (Kamra, 2005).

ברמת הגנום, אוכלוסיית המיקרופלורה של פרט בוגר די יציבה, ואף ברמת המין השינויים באוכלוסיית המיקרופלורה הם מינוריים, עיקר השונות מתבטא ברמת הקווים השולטים בנקודת זמן מסוימת (Isolauri et al., 2004).

במהלך ההמלטה, הוולד נחשף למיקרואורגניזמים שבווגינת אמו וזהו המקור הראשון למיקרואורגניזמים המתיישבים במעי. כיוון שהסביבה ותנאיה משתנים לאורך מערכת העיכול ניתן למצוא מק״א שונים באתרים שונים. זרימה מהירה בחלק העליון של מערכת העיכול אינה מאפשרת הצטברות כמות גדולה של מיקרואורגניזמים. בחלק התחתון של מערכת העיכול זרימת

המעכל איטית יחסית והרכב המעכל בעל השפעה ירודה כאנטי-מיקרוביאלי כך שמתאפשרת התבססות של אוכלוסיות מיקרואורגניזמים באזור זה. בגלל שאזור זה מאופיין באווירה אנארובית, מספר המק"א האנארובים גובר על מספר האאירובים. ניכרים גם הבדלים דרמטיים בין אוכלוסיית הלומן לאוכלוסיית המוקוזה: בעוד שסביבת הלומן היא בעיקרה אנארובית, בסביבת המוקוזה תיתכן דליפת חמצן מן הרקמות כך שתיווצר סביבה מיקרו-אארובית. בנוסף, תאי panet במוקוזה מפרישים חומרים אנטי-מיקרוביאלים ומתרחש גם מעבר של IgA מכיוון הלמינה-פרופרייה ללומן. הבדלים אילו גורמים ליצירת אוכלוסיות מק"א בהרכבים שונים בלומן ובמוקוזה. לכן, ניתן להניח שבאותו מין נמצא קווים שונים במוקוזה ובלומן (Isolauri et al., 2004).

1.5.2. שינוי הרכב האוכלוסייה

קיים עניין רב באפשרויות לשנות את הרכב המיקרופלורה במערכת העיכול באמצעות מזון או מרכיבי מזון. המטרה היא להעלות את מספר ופעילות המיקרואורגניזמים שהם, כנראה, בעלי מאפיינים חיוביים התורמים לבריאות המאכסן כגון מיני ביפידובקטריום ולקטובצילוס (Holzapfel et al., 1998).

עם זאת, פעולת רוב המיקרואורגניזמים במערכת העיכול אינה ידועה ולמרות האתגר לנסות ולתייגם כמועילים וכפתוגנים, מהלך זה אינו מוצדק שכן מינים מסוימים עשויים להועיל ברמות נמוכות ולהזיק (או לא להועיל) ברמות גבוהות. כך שהפוטנציאל הפרוביוטי, אפילו בין מיני בקטריות השייכות לאותו סוג משתנה וקשור להבדלים שבאתרי ההיקשרות, אפקטים אימונולוגיים והשפעה על המוקוזה (Isolauri et al., 2004).

1.6. השפעות DFM (מה זה DFM ??)במע"ג

1.6.1. השפעות DFM במע"ג לפני גמילה

במע"ג לפני גמילה מטרת מתן DFM היא ביסוס ושמירה על אוכלוסייה "נורמאלית" של מיקרופלורה במעי שכן זו תמנע גדילת יתר של פתוגנים פוטנציאליים, ופחות קשורה בביצועים (תוספת משקל, יעילות ניצול מזון) שכן מחלות מעיים הן שכיחות ביותר בשלב זה והתגובות החשובות לתוספים פרוביוטיים יהיו ירידה בשכיחות או בחומרת השלשולים (Krehabiel et al., 2003; Isolauri et al., 2004). שכיחות שלשולים מהווה מדד ל"אופי" אוכלוסיית המיקרופלורה. חוקרים רבים הציעו כי בע"ח המפרישים צואה נורמאלית, סביר שיפרישו פחות בקטריות פתוגניות. זוהי ככל הנראה תוצאה של מצב שבו החיה אינה חווה בעיית מעיים כלשהי (Krehbiel et al., 2003; Abu-Tarbush et al., 1996).

Abu-Tarbush וחובריו דיווחו כי עגלים שקיבלו תוסף של L. acidophilus הראו ירידה ניכרת בשכיחות שלשולים בשבועות 5-8 לחייהם (Abu-Tarbush et al., 1996). Cruywagen וחובריו מצאו כי עגלים שקיבלו תוסף פרוביוטיקה לתחליף החלב הראו שיפור בתוספת משקל יומית, בגילאים 0-14 יום, ללא השפעה על צריכת ח"י, יעילות ניצול מזון ותדירות שלשולים

(Cruywagen et al., 1996). Fumiaki וחובריו מצאו השפעות נרחבות יותר על עגלים וחזירים שאך נולדו: בעגלים, ניכר שיפור בתוספת משקל גוף לעומת הביקורת, וירידה בתדירות השלשולים. בחזירונים, תוספת משקל הייתה גבוהה יותר באופן מובהק בקבוצה שקיבלה פרוביוטיקה, וכן נצפתה ירידה באחוזי התמותה (Fumiaki et al., 1995). גם Chang וחובריו הראו כי מתן פרוביוטיקה לחזירונים למשך 28 ימים העלתה את ספירת חיידקי הלקטובצילוס בצואה, והורידה ספירת בקטריות פתוגניות במקביל לנעכלות טובה יותר ותוספת משקל: קבוצות הפרוביוטיקה אכלו פחות (11-34%) אך הגיעו למשקל ממוצע דומה לזה של קבוצות הביקורת (ללא תוסף כלל או תוסף אנטיביוטי) (Chang et al., 2001). Ohya וחובריו הראו כי עגלים שהודבקו בחיידק הפתוגני E.coli החלו להפרישו בצואה יום לאחר ההדבקה. לאחר מכן טופלו במנת פרוביוטיקה, והפסיקו להפריש חיידק זה בצואה וגם לא שבו להפרישו במשך 3 השבועות העוקבים (Ohya et al., 2001).

Ewaschuk וחובריה בדקו הישרדות L. rhamnosus במעי עגלים באמצעות בדיקות זיהוי החיידק בצואה: 5 עגלים קיבלו מנה גבוהה של החיידק הפרוביוטי ($2*10^{11}$ CFU) למשך 3 ימים ברציפות. לאחר 24 שעות (מתחילת הניסוי) החיידק נמצא בצואת כל העגלים, לאחר 48 שעות, החיידק נמצא ב-4 עגלים, לאחר 3 ימים הוא נמצא ב-3 עגלים, ולאחר 7 ימים (מתחילת הניסוי) רק עגל אחד המשיך להפריש החיידק בצואה. הם הסיקו שהחיידק שורד במעי כל עוד הוא ניתן (Ewaschuk et al., 2004).

עגלי בקר לבשר המועברים כקבוצה להזנת מרעה עוברים שינוים רבים כגון גמילה מחלב, העברה למקום חדש, התכנסות לעדר, סירוס, חיסון, הסרת קרניים. כל אילו גורמים לסטרס היכול לגרום לשינוי הרכב האוכלוסייה המיקרוביאלית בכרס, ועקב כך לירידה בביצועים ואבדן הכנסה עקב עלייה בתחלואה ותמותה. מתן DFM לאכלוס המעי יכול להפחית שינויים אילו. בתחילת שנות ה-80 נעשו מספר מחקרים בתחום זה, בחלקם נמצא כי מתן DFM לתקופה ממוצעת של 30 יום העלה את תוספת המשקל היומית וצריכת המזון ושיפר את היחס שבין צריכת מזון לעליה במשקל בנוסף לירידה באחוזי התמותה. בחלק אחר של המחקרים לא נמצאו השפעות (Krehbeil et al., 2003).

1.6.2. השפעת DFM על תפוקת חלב והרכבו

בתוספת DFM (שמרים ממין S.cervisiae) לפרות חולבות, נראתה עליה קלה בתפוקת חלב וכן עליות ניכרות באחוז השומן בחלב ובתפוקות חלב מושווה שומן (FCM) ושומן, כמו כן, תכולת החנקן בחלב עלתה (Giger-Riverdin et al., 1996). עם זאת קיימים מחקרים אחרים שבהם הוזנו פרות חלב ב- L.acidophilus ובהם לא חל שינוי באחוזי שומן וחלבון בחלב אך ניכרה עליה בתפוקת החלב למרות שלפעמים נצפתה ירידה בצריכתח"י (Krehbeil et al., 2003).

Ware וחובריו מצאו כי תוספת של $2*10^9$ CFU של L.acidophilus ליום העלתה את תפוקת החלב ב- 1.8 קג' / יום לעומת קבוצת הביקורת, בעוד שערכי שומן החלב וחלבון החלב לא השתנו (Ware et al., 1988). Williams וחובריו בדקו השפעת שמרים מסוג Saccharomycetes cervisae על פרות חולבות (7-12 שבועות בתחלובה) ומצאו כי חלה עלייה בצריכת ח"י ובתפוקת החלב (Williams et al.,1991).

מחקרים אחרים בדקו השפעת השילוב בין בקטריות ושמרים על תפוקת חלב והרכבו ומצאו כי חלו עליות של תפוקות החלב של כ- 1 קג' / יום (Krehbiel et al., 2003).

באופן כללי, ברוב המחקרים שדווח בהם על השפעת תוספים פרוביוטיים על תפוקת חלב והרכבו נמצאה תגובה עקבית של עליה בתנובה בעוד שההשפעות על הרכב החלב משתנות (Krehbiel et al., 2003).

1.6.3. השפעת הרכב המנה על השפעות DFM

Biricik & Turkmen (2001) בדקו השפעת תוספת שמרים ל- 2 מנות שונות (70%, 30% מ"מ) בכבשים. נראה כי השפעת DFM (שמרים ממין S.cervisiae) גדולה יותר כאשר המנה מבוססת על מזון גס. במנה הכוללת 70% שחת אספסת, נעכלות ח"י, חומר אורגני ו- NDF עלתה בנוכחות שמרים, לעומת מנות שהיו מבוססות על 70% מזון מרוכז בתוספת שמרים או מנות שכללו 70% שחת אספסת ללא שמרים. נראה כי אופן הפעולה של שמרים הוא באמצעות שמירה על סביבה אנארובית בכרס על ידי צריכת חמצן. פעולה זו מחזקת את האוכלוסייה האנארובית ופעילותה בכרס , דבר החשוב במיוחד בעיכול צלולוז (Biricik & Türkmen, 2001). Giger-Reverdin (1996) וחובריו מצאו כי תוספת שמרים לעזים בשבוע 0-6 לאחר המלטה העלתה ניתוב של רזרבות גוף והעלתה ייצור NEFA, ניכרה גם עליה בייצור שומן החלב ולכן תפוקת FCM עלתה, תופעות אילו החריפו את תופעת המאזן האנרגטי השלילי בעזים לאחר המלטה. תוספת השמרים לא שינתה צריכת ח"י (המנות היו איזואנרגטיות) וכן לא נמצא שינוי בתכולות חלבון, לקטוז, אפר, ח"י, ואוריאה בחלב. הירידה הגדולה ביותר ברמת האנרגיה הייתה בקבוצה שקיבלה שמרים כתוספת למנה שכללה רמה לא מספקת של חנקן, דבר זה מוסבר ע"י ההשפעה המגבירה שיש לשמרים על יצור FCM. על פי Giger-Reverdin השמרים יכולים להוות מקור לנוטריינטים עבור המק"א בכרס, מה שיוביל לעליה בחלבון המיקרוביאלי. תופעה זו משמעותית בעת מתן מנה עם רמת חנקן לא מספקת בעצם הגדלת זרימת החנקן לדאודנום (Giger-Reverdin et al., 1996).

1.6.4. השפעת DFM על מערכת החיסון

התפקיד העיקרי של מערכת העיכול הוא כמובן עיכול וספיגת נוטריינטים לצורך גדילה והתפתחות. במקביל המוקוזה במעי מהווה מחסום המגן על המאכסן כנגד נוכחות מתמדת של אנטיגנים החודרים למערכת העיכול יחד עם המזון ומיקרואורגניזמים פתוגנים בחלל מערכת העיכול. מערך ההגנה כולל פקטורים רבים כגון רוק, חומצות עיכול, פריסטלטיקה, מוצין

(mocus) פרוטאוליזיס וכן- פלורת המעי הנורמאלית וממברנה אפיתליאלית. למיקרופלורת המעי תפקיד חשוב במספר מערכות פיסיולוגיות בגוף המאכסן, כולל בגרות רקמות הלימפה הקשורות למערכת העיכול בחודשים הראשונים לחיי המאכסן. הוכח כי מתן אוראלי של חיידקי LAB פרוביוטים מגביר תגובות חיסוניות נרכשות ומולדות הן ברמה המקומית והן ברמה המערכתית (Isolauri et al., 2001). השפעות התוספים הפרוביוטיים, שהן מעבר להשפעות התזונתיות, קשורות כנראה באופן בלתי ישיר ליכולתם לאזן את מיקרופלורת מערכת העיכול ו/או השפעתם המסייעת בייצור פקטורי מערכת החיסון כגון ציטוקינים (Isolauri et al., 2001; Benyacoub et al., 2003). לעיתם הן נחשבים כווקטורים פוטנציאליים בייצור והסעת אנטיגנים בתוך מערכת העיכול (Dunne et al., 1999).

היפותזה אפשרית בנוגע להשפעת חיידקים פרוביוטיים על מערכת החיסון גורסת כי אוכלוסיית מק״א נורמאלית הנרכשת מייד לאחר הלידה דרושה להתפתחות מערכת החיסון הסיסטמית והמוקוזית ביילוד, בנוסף להכוונת התגובה הדלקתית באלרגיות. במידה ואכן כך הדבר, בקטריות פרוביוטית יכולות לנגוד תגובות דלקתיות על ידי ייצוב סביבת המיקרואורגניזמים במעי, השפעה על חדירות המעי וע״י עידוד פירוק אנטיגנים פנימיים ושינוי העמידות שלהם. באמצעות פעילויות אלו הבקטריות הפרוביוטיות מספקות פעולת חיסון בתקופות קריטיות או תקופות סיכון שבהן מצב חיסוני לא מיטבי עלול להוביל למחלות קליניות (Isolauri, 2004; Isolauri et al., 2001).

נצפה כי מתן DFM משפיע על מע׳ החיסון המולדת ההומרלית והתאית. מתן אוראלי של לקטובצילוס הגביר פעילות פגוציטוטית ו- NK וגם העלה יצור IgA והוריד יצור IgE בבני אדם ובע״ח (Simon, 1999)-L. rhamnosus Tejada ו- L. bulgaricus השרו יצירת אינטרלאוקינים 2, 6, 10 וכן TNF α וציטוקינים הקשורים ל- Th-1 (IL12, IL18, IFN-γ).

במחקר שבוצע על ידי Benyacoub וחובריו בשנת 2003, ניתנו חיידקים מזן E.faecium לגורי כלבים כתוסף למזון יבש. בבדיקות התגלה כי גורים אילו הראו ערכים גבוהים יותר של total IgA, מספר תאי B בוגרים וכן הראו תגובה חזקה יותר לחיסון CDV שקיבלו (Canine distemper virus) באמצעות רמה גבוהה יותר של IgA ו- IgG ספיציפים, כמו כן ביטוי MHC2 של מונוציטים היה גבוה יותר בהשוואה לקבוצת ביקורת שקיבלה מזון יבש בלבד (Benyacoub et al., 2003).

גם Perdigón וחובריו מצאו כי תוספת חיידקי ח׳ לאקטית העלו רמות IgA באמצעות אינטראקציה עם תאי M. הם מצאו כי המינים L.plantarum ו- L.casaei הגיבו עם תאי payers patch והראו עליה ב- IgA, CD4 ונוגדנים. L.acidophilus השרה אקטיבציה של מוקוזת המעי ע״י אינטראקציה עם תאים אפיתליאלים (Perdigón et al., 1998).

אם כן, ראינו כי מנגנונים עיקריים של חיידקים פרוביוטים בתחום מערכת החיסון כולל מנגנון קידום מחסום הגנה במעי (הגנה שאינה אימונולוגית וכוללת נירמול חדירות המעי ושינוי המיקרואקולוגיה במעי) בנוסף להגנה אימונולוגית (הכוללת שיפור תגובתיות IgA ושיפור התגובה הדלקתית), המביאים לכדי הוצאה איכותית וכמותית של אנטיגנים ובעיקר- רגולציה של מערכת החיסון (Isolauri et al., 2001).

1.6.5. השפעת DFM על תסיסה בכרס

ייתכן שחיידקים מיצרי לקטאט עוזרים במניעת אצידוזיס בכרס בפרות חלב כיון שהם מרגילים את הסביבה המק״א בכרס לנוכחות חומצה לאקטית וכך המעבר ממזון גס למרוכז הוא קל יותר עבור הפרה(Nocek et al., 2002; Yoom & Stern, 1995).

Kung & Hession הראו כי בתרביות של מיץ כרס בתוספת LAB (M.elsdenii) ה- pH ירד ל-5.3, לעומת 4.8 בביקורת שלא קיבלה LAB. בנוסף, ריכוז הלקטאט בתוספת LAB היה 5mM לעומת 40mM בביקורת, לאחר 8 שעות ממתן התוסף. בתוספת ה- LAB הייתה גם עליה בריכוזי בוטיראט, וולאראט וחומצות שומן מסועפות (Kung & Hession, 1995). Beauchemin וחובריו מצאו כי תוספת החיידקים מייצרי לקטאט E.faecium למע״ג הרועים בשטח פתוח, העלתה רמות פרופיונאט, הורידה בוטיראט, עודדה זרימת חנקן מזוני לדאודנום (תוך הפחתת רמות חנקן מק״א) והעלו רמות קוליפורמים בצואה, כשהוסיפו גם שמרים, תופעות אילו נעלמו (Beauchemin et al., 2003). ב- 2 הניסויים הנ״ל לא נצפתה השפעה על תופעות של אצידוזיס.

בניסוי In situ שבוצע ע״י Weinberg et al.(2003) , בתוספת תחמיץ מודבק ב- LAB למיץ כרס, התקבל pH פחות נמוך מאשר בדוגמאות מיץ כרס ותחמיץ שלא כללו LAB. כפי שניתן להסיק, משמעות גדולה יש למינים הכלולים ב- DFM ולשילוב ביניהם: Miller-Webster et al.(2002) בדקו השפעת תוספת שמרים מסוגים שונים למנת חולבות. ניתן לומר כי תוספת השמרים העלתה נעכלות ח״י, חלבון ויצור חומצה פרופיונית (ולכן הורידה רמות חנקן עוקף כרס), אולם בין סוגי השמרים נצפו הבדלים בהשפעות, כאשר בסוג אחד נצפתה רמה גבוהה יותר של חומצה פרופיונית, ירידה ברמת האצטאט ו- pH מינימאלי נמוך יותר מאילו שנצפו בעבור הסוג השני.

פרופיונאט הוא פרקורסור חשוב בסינתזת גלוקוז במע״ג ולכן בעל השפעה רבה על שחרור הורמונים וחלוקת הנוטריינטים בין הרקמות. מאחר ובתחילת הלקטציה צריכת המזון אינה עונה על צרכיה האנרגטיים של החיה, בייחוד בפרות חלב, אספקת פרופיונאט באמצעות Propionibacterium המייצר פרופיונאט, יכולה להועיל. בניסוי של Kim et al.(2000) נמצא כי ככל שניתנה מנת P.acidipropionici גבוהה יותר, רמת הפרופיונאט בכרס עלתה. במנות עם רמת מ״מ, נראה שהתוספת משפיעה על הכרס ברמת יצור יותר פרופיונאט ופחות אצטאט ובוטיראט. כשהתוסף הוסר, רמות הבוטיראט כמעט חזרו לאילו שלפני הניסוי. בניגוד לכך Ghorbani et al. (2002) לא מצא שינויים בריכוזי לקטאט, חש״ן כללי או ספציפי בתוספת DFM, אולם מצא

שריכוז CO_2 בדמם היה נמוך יותר, כמו גם ריכוזי LDH, מה שמצביע על כך כי הזנה בבקטריות מייצרות לקטאט יחד עם בקטריות מנצלות לקטאט יכול להוריד סיכוי לאצידוזיס מטבולי. נמצא גם כי תוספת DFM העלתה כמות הפרוטוזואה בכרס והורידה רמת בקטריות עמילוליטיות.
האם אפשר לקצר את 1.6 מתיש!!!

1.7. סיכום השפעות אפשריות על מעלי-גירה.

ייתכן כי תוספת DFM מורידה סיכוי לאצידוזיס סאב-אקוטי באמצעות הפחתת הזמן שבו ה-pH בכרס הוא מתחת ל- 5.6. נראה שתגובות אילו תלויות במינים הספציפיים שב- DFM. בנוסף, עיכוב ייצור מתאן באמצעות יצור לקטאט כנראה מעודד יצור פרופיונאט ע"י Propionibacterium ומשפר יעילות אנרגטית בכרס, ולכן גם את ביצועי החיה.

תוספת DFM למע"ג מורידה אחוז תחלואה בדיזינטריית הבקר ביונקים, מעלה תפוקת חלב בפרות חולבות, מורידה תמותה בעגלים בגמילה ו/או כאלו עברו לשטח פתוח, משפרת תוספת יומית ומשקל שלד. תוספת DFM גם מקטינה ריכוזי E.coli בצואה.

למרות שמנגנוני הפעילות לא לגמרי ידועים, נראה כי תכונות של היצמדות, קולוניזציה, עיכוב וגירוי מערכת החיסון חשובות עבור שיפור הבריאות באמצעות DFM. בנוסף, הם יכולים להעלות ריכוזי חומצה פרופיונית ולהקטין את האזור בכרס הסובל מאצידוזיס סב-אקוטי.

1.8. מטרות המחקר

מטרות המחקר בעבודה זו הן:

- בדיקת הישרדות והעשרת זני Lactobacillus ו- Enterococcus בכרס ובמערכת העיכול התחתונה במעלי גירה בוגרים.
- הערכת תרומת תוספי מזון פרוביוטים (המיוצרים על ידי חברת Conklin Inc. ונקראים Fastrack: אבקה ליונקים Probiotic Pack, liquid dispersible, kick-of) לשיפור ביצועים ומצב בריאותי של גדיים לפני ואחרי גמילה, וכן, תחת מנות הזנה בהרכבים שונים.

2. חומרים ושיטות

2.1. חומרים ותמיסות

- חומצה טונגסטית:
  9 מ"ל חומצה גופרתית N/12
  1 מ"ל Na-Tungstate 10%

- ראגנט צבע:
  250 מ"ל חומצה זרחתית 60%
  50 מ"ל ראגנט DAM-TSC (600 מ"ג Diacetyl Monoxime, 30 מ"ג Thiosemicarbazide, 100 מ"ל DDW).

- חומצה מטהפוספורית 25%

- חומצה איזוקפרואית 5mM

- TCA

- תמיסת פנול:
  25 גרם גבישי פנול
  0.125 גרם גבישי NaNitroferricyanide
  500 מ"ל DDW

- תמיסת היפוכלוריט:
  170 מ"ל תמיסת סודיום-היפוכלוריט
  12.5 גרם NaOH גבישי
  230 מ"ל DDW

- lysate buffer:
  1.5 ml EDTA 0.5M
  1.5 ml SDS 10%
  1ml Tris HCl 1.5M pH=8.8
  11 מ"ל DDW

- PCI:
  2.5 מ"ל פנול
  2.4 מ"ל כלורופורם
  100 מיקרוליטר איזואמיל אלכוהול.

- סיילין (תמיסה פיזיולוגית):
  9 גרם מלח
  1 ליטר DDW.

- Buffer saturated phenol, pH=7

- PBS

- סודיום אצטאט 3M, pH=7.

- אתנול 100%

- אתנול 75%

2.2. שיטות חלק א'

2.2.1. מהלך הניסוי

ניסוי In vivo התבצע בשני כבשים מקונלים. בוצעה בדיקת הישרדות והעשרת זני לקטובצילוס ואנטרוקוקוס בכרס, בתוספת כמויות הולכות ועולות (0-50 גרם, במרווחים של 10 גרם) של תכשיר פרוביוטי הנקרא Fastrack® Probiotic Pack המיוצר על ידי חברת ©2000 Conklin Inc. 459299E 1100 (Conklin Company Inc. Animal Products Division. 551 Valley Park Drive P.O.Box 155 Shakopee, MN 55379 USA.).

התכשיר הפרוביוטי הנו אבקה ליונקים liquid dispersible, המיוצרת על ידי חברת Conklin Inc., ומורחפת על גבי גרעיני סויה. האבקה מכילה ב- 1 גרם את המרכיבים הבאים: לפחות 880 CFU מחיידקי Enterococcus faecium ו- Lactobacillus acidophilus, 880 מיליון תאי שמרים

חיים Saccharomyces cervisiae, פרוטאיז מ Bacillus subtilis- לא פחות מ- 4225 PC . עמילאז מ- Bacillus subtilis ו- Aspergillus oryzae- לא פחות מ- 2535 BAU.

התכשיר הפרוביוטי הוסף, כמוסבר לעיל, למנת קיום של כבשים. המנה כללה מזון גס (שחת שיבולת שועל) ותערובת חולבות ביחס 1:1. המנה הכילה 12% חלבון כללי ו- 44% NDF על בסיס חומר יבש.

תקופת טיפול ארכה 14 יום, ביום 14 בכל תקופת טיפול נלקחו דגימות מיץ כרס וצואה ומייד הופקו מהן חיידקים. החיידקים נשמרו ב- 20°c- עד להפקת DNA. בנוסף נלקחו גם דגימות דם, הפלסמה הופרדה על ידי סרכוז ב- 1500 ×g ל-15 דקות ונשמרה גם כן ב- 20°c- עד לבדיקת שתנן. דוגמאות מיץ כרס סוננו דרך 4 שכבות בד גזה ונשמרו בטמפרטורה 20°c- ושימשו מאוחר יותר לקביעת ריכוז חומצות שומן נדיפות (חש"ן), אמוניה ו- pH.

2.2.2. בדיקת השתנן בפלסמה

בדיקת השתנן נעשתה בשיטה קולורימטרית על פי Coulomb and Favreau, (1963): 0.1 מ"ל פלסמה מכל דוגמא הועבר למבחנה שבה 0.9 מ"ל חומצה טונגסטית. לאחר המתנה של כ- 5 דקות וסרכוז במהירות 1000 ×g למשך 10 דקות, 0.1 מ"ל מן התצליל הועבר למבחנה חדשה (ב-3 חזרות). בשלב זה הוספו לכל מבחנה 3 מ"ל של ראגנט צבע. כל המבחנות הושארו לרתיחה במים 20 דקות, לאחר מכן קוררו לטמפרטורת החדר ונלקחו לקריאת בליעה אופטית (O.D) בספקטרופוטומטר באורך גל 540 ננומטר.

ריכוז השתנן וכן רמת חנקן בשתנן נקבעו ע"י הכנת עקומת סטנדרט ונוסחת רגרסיה מתאימה כאשר Y הנו ריכוז רמות הסטנדרט של md/dl Urea או N-Urea , ו-X הנו הבליעה האופטית שהתקבלה בבדיקה.

2.2.3. בדיקת חש"ן במיץ כרס

0.4 מ"ל מיץ כרס הושמו בתוך מבחנה שהוספו לה גם כן 0.1 מ"ל חומצה מטהפוספורית 25%, ו- 0.1 מ"ל חומצה איזוקפרואית בריכוז 5mM. המבחנות סורכזו ונשמרו בטמפ' 4°c עד לקריאתן במכשיר GLC (Model 5890; Hewlett Packard, Avondale, PA) למחרת היום. החישוב נעשה אל מול סטנדרט פנימי.

2.2.4. בדיקת אמוניה במיץ כרס

השיטה לבדיקת אמוניה במיץ כרס מתוארת במאמרו של Krom, 1980: מיץ כרס שסונן דרך 4 שכבות בד גזה עורבב עם 20% TCA ביחס 1:1. מכמות זו נלקח 1 מ"ל מכל דוגמא וסורכז 15 דקות במהירות 4500 ×g. 0.5 מ"ל מהתצליל הועבר למבחנה חדשה והוספו לו 4.5 מ"ל מים מזוקקים פעמיים DDW, המבחנות עורבבו מעט ומתוכן נלקח למבחנה חדשה 0.5 מ"ל , למבחנה

זו הוספו גם 0.5 מ״ל תמיסת פנול , 0.5 מ״ל תמיסת היפוכלוריד ו-1.5 מ״ל מים מזוקקים פעמיים. הבדיקה נערכה ב- 3 חזרות ולאחר כ-15 דקות, נלקחו לקריאת בליעה אופטית (O.D) בספקטרופוטומטר באורך גל 630 ננו מטר.

ריכוז האמוניה נקבע ע״י הכנת עקומת סטנדרט ונוסחת רגרסיה מתאימה כאשר Y הנו ריכוז רמות הסטנדרט ב- µgN/ml, ו-X הנו הבליעה האופטית שהתקבלה בבדיקה.

2.2.5. בדיקת pH במיץ כרס

רמת החומציות במיץ כרס שסונן דרך 4 שכבת בד גזה נבדקה באמצעות מכשיר pH-מטר.

2.3. תאים:

תאי חיידקים הופקו מדגימות מיץ כרס וצואה שנלקחו בתום כל תקופת טיפול. החיידקים נשמרו ב – 20°c- עד להפקת DNA.

2.3.1. בידוד חיידקים ממיץ כרס וצואה

מהלך בידוד החיידקים ממיץ כרס כלל הוספת סיליין (ביחס נפחי 1:1), התערובת עורבבה בהומוגנייזר וסוננה דרך 4 שכבות בד גאזה. (לאחר שלב זה הוצאו 2 מ״ל למבחנת פלסטיק, והוספו להם 2 מ״ל TCA 20% לשם בדיקות אמוניה, כמתואר לעיל). מיץ הכרס המסונן סורכז במהירות 500 ×g במשך 15 דקות ב-4°c לצורך הרחקת חלקיקי מזון ופרוטוזואה. הנוזל המכיל את החיידקים הועבר למבחנה מתאימה לשם סרכוז ב- 17000 ×g במשך 20 דקות ב- 4°c. הנוזל נשפה באמצעות וואקום והמשקע המכיל את החיידקים נשטף בסיליין וסורכז שנית ב- 17000×g למשך 20 דקות ב- 4°c. הנוזל נשפה והמשקע נשמר בהקפאה (-20° c) עד להפקת ה – DNA.

מהלך בידוד החיידקים מדגימות הצואה מהכבשים היה זהה מלבד תוספת שלב מקדים שכלל את טחינת הצואה בבלנדר יחד עם הסיילין.

2.3.2. הפקת DNA

הפקת DNA מחיידקי מיץ כרס וצואה נעשתה לפי (2002) .Matsuki et al. דוגמאות החיידקים הופשרו ונמהלו עם PBS×1 ביחס 1:10, לכל מבחנה הוספו כדורי זכוכית בקוטר 1mm והמבחנה נוערה היטב לשם שבירת תאי החיידקים. מכל מבחנה נלקחו 200µl והועברו לאפינדורף נקי של 2ml (במקרה והדוגמה הייתה פחות מ-1 מ״ל אזי נלקחו 400µl). הוסף 1 מ״ל PBS×1 והדוגמאות סורכזו ב- 12000 ×g במשך 10 דקות. הנוזל נשפה והמשקע נשטף שנית וסורכז באותם התנאים. לבסוף הנוזל נשפה, והוספו למשקע הנתר 500µl lysate buffer, 500µl buffer saturated phenol וכדורי זכוכית בקוטר 0.5mm. המבחנה עורבבה בוורטקס במשך 30 שניות וסורכזה ב- 12000 ×g ל- 10 דקות. בתום הסירכוז 400µl נשפו מן הנוזל העליון והועברו למבחנה

נקייה שאליה הוספו 400µl תמיסת PCI. המבחנה עורבבה בוורטקס וסורכזה ב- 12000 ×g ל-10 דקות. בתום הסירכוז 250µl נשפו מן הנוזל העליון והועברו למבחנה נקייה. בשלב זה בוצעה השקעה באתנול עפ"י השלבים הבאים: הוספת 25µl סודיום אצטאט 3M pH=7 (0.1 vol), ערבוב בוורטקס, והוספת 625µl אתנול 100% (2.5 vol), ערבוב נוסף בוורטקס והכנסה ל- 80°c- למשך 30 דקות, לאחר הוצאה מההקפאה המבחנות עורבבו בוורטקס, ולבסוף סורכזו ב- 12000 ×g ל-20 דקות. בתום ההשקעה באתנול שפינו את הנוזל בעדינות וייבשנו באוויר את המבחנות לכמה דקות. לצורך שטיפת פלט ה- DNA הוספו 600µl אתנול 75%, והמבחנה סורכזה במהירות 12000 ×g ל-10 דקות. בתום הסרכוז הנוזל נשפה והפלט יובש באוויר למספר דקות שבסופן הומס הפלט ב- 30µl DDW (מים מזוקקים פעמיים).

2.3.3. קביעה כמותית של DNA

מכל דוגמא נלקחה דגימה לשם קביעת ריכוז כלל ה- DNA. הצפיפות האופטית (O.D) של הדוגמאות המהולות נקבעה באורך גל של 260 ננומטר. ריכוז ה-DNA חושב לפי הנוסחה:

O.D. x 50 x dilution = DNAµg/ml

2.4. Real Time RT-PCR

ב Real Time RT-PCR נעשה שימוש בערכה qPCRTMMastermix for SYBR® Green ובפרוטוקול על מנת להכין את הדוגמאות השונות לנפח סופי של 18 מיקרוליטר: 9µl של Reaction buffer , 2 µl cDNA, 2 µl פריימרים ספציפיים בריכוז של 25pM (בבדיקת נוכחות חיידקי אנתרוקוקוס) או בריכוז של 12.5pM (בבדיקת נוכחות חיידקי לקטובצילוס), ו- 5 µl מים מזוקקים פעמיים DDW. ריאקצית ה - PCR כללה 40 מחזורים של אמפליפיקציה (Malinen et al., 2003).

בתום כל תקופת טיפול, רמת התבטאות של ה- DNA הגנומי של החיידק המבוקש (אנתרוקוקוס או לקטובצילוס) נבחנה באמצעות פריימרים ספציפיים.

התוצאות מוצגות כך שרמת התבטאות ה- DNA הספציפי לחיידק הינה יחסית לרמת התבטאות ה- DNA הגנומי הכללי המייצג את כלל אוכלוסיית החיידקים במשפחה.

- יחוס רמת הביטוי של החיידק הנבדק מול רמת הביטוי של כלל אוכלוסיית החיידקים בכל טיפול חושב לפי:

$$\Delta C_{T\,(dose\ n)} = C_{T\ specific\ DNA\ (dose\ n)} - C_{T\ general\ DNA\ (dose\ n)} \qquad (n = Probiotic\ dose)$$

- יחוס רמת הביטוי של החיידק הנבדק בכל טיפול מול רמת הביטוי של אותו החיידק בביקורת:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\ dose\ n} - \Delta C_{T\ dose\ 0}$$

תרגום תוצאות $\Delta\Delta Ct$ לרמת ביטוי- $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

הפריימרים בהם השתמשנו במהלך העבודה :

פריימר כללי לבקטריות, נבחר בהתאם לאזור שמור של ה- 16s rRNA של כלל החיידקים בכרס :

V316s1 CACGGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG

V316s2 ATTACCGCGGTGCTGG

פריימר מתאים ל- Enterococcus faecium :

מתוך Werner et al. (2004)

23S_TQF ACCGAACTGTCTCACGACGTT

23S_TQR CCCAAGGGTTGGGCTGTT

פריימר מתאים ל- Lactobacillus acidophilus 16s rRNA :

על פי גן מספר gi:6537241 הלקוח מ-gene bank.

LAC F AGGACTGCAAAGTGGTAGCGTAA

LAC R CTGCTAGGCGCGCTC

2.5. חלק ב'

ניסוי זה, על שני חלקיו (ב' + ג'), בוצע במטרה להעריך תרומת תוספי מזון פרוביוטים (המיוצרים על ידי חברת Conklin Inc., סדרת FASTRACK: Probiotic Pack, liquid dispersible, kick-of) לשיפור ביצועים ומצב בריאותי של גדיים לפני ואחרי גמילה, וכן, תחת מנות הזנה שונות.

2.5.1. מהלך הניסוי

גדיים חולקו מייד לאחר לידתם באופן אקראי ל- 2 קבוצות. לפחות 10 גדיים בכל קבוצה. תאומים הופרדו ל-2 קבוצות באופן אקראי. בקבוצה אחת גידול הגדיים עפ"י ממשק סטנדרטי – קבוצת ביקורת, ובקבוצה השנייה הגדיים קיבלו תוסף מזון פרוביוטי עפ"י גילם (בהתאם להוראות היצרן)– קבוצת טיפול.

מיום ההמלטה ועד גיל 5 ימים קיבלו היונקים אבקת Kick of ליונקים המיוצרת על ידי חברת Conklin Inc. המכילה ב- 1 גרם את המרכיבים הבאים : לפחות 1 מיליארד מושבות מחיידקי Enterococcus faecium ו- Lactobacillus acidophilus, 200 מיליון שמרים חיים Saccharomyces cervisiae, לפחות 2500 פרוטאיז מ Bacillus subtilis, לפחות 15,000 עמילאז

מ- Bacillus subtilis ו- Aspergillus oryzae, ויטמין A 600 יחב״ל, ויטמין D 1250 יחב״ל, ויטמין E 50 יחב״ל וכן – ניאצין 3 מ״ג, טיאמין 1.25 מ״ג, ויטמין B12 35 mcg.

מגיל 6 ימים ועד גיל גמילה (60 יום) קיבלו היונקים אבקת liquid dispersible , המיוצרת על ידי חברת Conklin Inc., המכילה ב- 1 גרם את המרכיבים הבאים: לפחות 880 CFU מחיידקי Enterococcus faecium ו- Lactobacillus acidophilus, 880 מיליון תאי שמרים חיים Saccharomyces cervisiae, פרוטאיז מ Bacillus subtilis- לא פחות מ- 4225 PC . עמילאז מ- Bacillus subtilis ו- Aspergillus oryzae- לא פחות מ- 2535 BAU.

כל גדי קיבל חלב טרי פעמיים ביום (בוקר וערב). החלב ניתן באופן ידני מבקבוקים מתאימים בעלי פטמות סיליקון. צריכת החלב נרשמה בכל הגמאה, עבור כל גדי. בקבוצת הטיפול הגדיים קיבלו 1 גר׳ של אבקת Kick-off לגדי (התכשיר הפרוביוטי), פעם ביום, במשך חמשת הימים הראשונים לחייהם. לאחר 5 ימים (החל מן היום השישי לחייהם) הגדיים יקבלו 1 גר׳ של אבקת Liquid dispersible לגדי, פעם ביום, עד הגמילה בגיל 60 יום. לאחר הגמילה, קבוצת הטיפול תמשיך לקבל תוסף פרוביוטי – Probiotic Pack המיוצר על ידי חברת Conklin Inc. ממנו קיבלו הגדיים 10 גר׳ ליום לגדי, עד גיל 90 יום. התוסף ניתן לגדיים באבוסים, מיד לאחר ניקויים משאריות, יחד עם 100 גר׳ תערובת טחונה (גודל 3 מ״מ). המזון ניתן רק לאחר שהגדיים סיימו לאכול את התוסף.

הגדיים קיבלו כמות מקסימלית של 1000 מ״ל חלב ליום ב-2 הגמאות עד גיל 30 יום. מיום 31 ועד יום 60 קיבלו הגדיים 500 מ״ל חלב טרי ליום, בבוקר. תערובת ומים ניתנו לגדיים באופן חפשי החל מיום 1 לניסוי. כמות השאריות באבוסים נרשמו מידי בוקר וכמות המזון שניתנה להם עודכנה בהתאם, כך שבכל יום קיבלו 10% יותר ממה שצרכו ביום הקודם. מנת השחת הוגבלה ל- 60 גר׳ ליום לגדי.

מדידות

הגדיים נשקלו בלידה, ומיד שבוע עד תום הניסוי. בגילאים 90, 60, 30 יום נלקחו דגימות דם מכל גדי, מן הוריד הג׳גולרי, הדמים נלקחו למבחנות עם מונעי קרישה (הפרין) לצורך בחינות פרוליפרציה של לימפוציטים. לצורך כך האנטיגן ConA שימש לגירוי לימפוציטים וחלוקת התאים נרשמה. כקבוצת ביקורת שימש דם שנלקח מעזים בוגרות. נילקח בחשבון גם מצב בריאותי ושימוש בתרופות.

תוצאות בחינות פרוליפרציה של לימפוציטים פורסמו בכנס השנתי ה-17 למדעי הבקר בפוסטר ״השפעת מתן תוסף פרוביוטי לגדיים מיד לאחר המלטה ועד גיל שלושה חודשים, על קצב גדילה ומטבוליטים בדם ובכרס״.

2.6. חלק ג'

2.6.1. מהלך הניסוי

בדומה לניסוי הקודם, ערכנו ניסוי נוסף ובו שתי הקבוצות קיבלו טיפול זהה לזה שקיבלה קבוצת הטיפול בחלק ב': קבוצה אחת הוגבלה במנת השחת, באופן זהה לקבוצת הטיפול בחלק ב' של הניסוי ואילו השנייה קיבלה שחת באופן חפשי. מטרת ניסוי זה הייתה לבדוק באם תוספת השחת תעזור בשימור מאזן החומציות בכרס, וכך יימנעו תופעות כגון ירידה כרונית ב- pH הכרס, תאבון ירוד ועליה לא מספקת של משקל גוף.

מדידות

הגדיים נשקלו בלידה, ומידי שבוע עד תום הניסוי. בגילאים 90, 60, 30 יום נלקחו דגימות דם מכל גדי, מן הוריד הג'גולרי. הדמים נלקחו למבחנות עם מונעי קרישה לבדיקת ערכים: אלבומין, N-אוריאה, גלוקוז, BHB, וריכוז AST. כמו כן, נלקחו דוגמאות מיץ כרס במטרה למדוד בו ערכי pH, וריכוז N-אמוניה.

מבחנות הדמים נשלחו למכון הווטרינרי בבית דגן, שם בוצעו אנליזות לממדים המפורטים.

בדיקת אמוניה במיץ כרס: נעשתה באותו אופן כפי שפורט בניסוי א'.

בדיקת pH במיץ כרס: נעשתה באותו אופן כפי שפורט בניסוי א'.

3. תוצאות

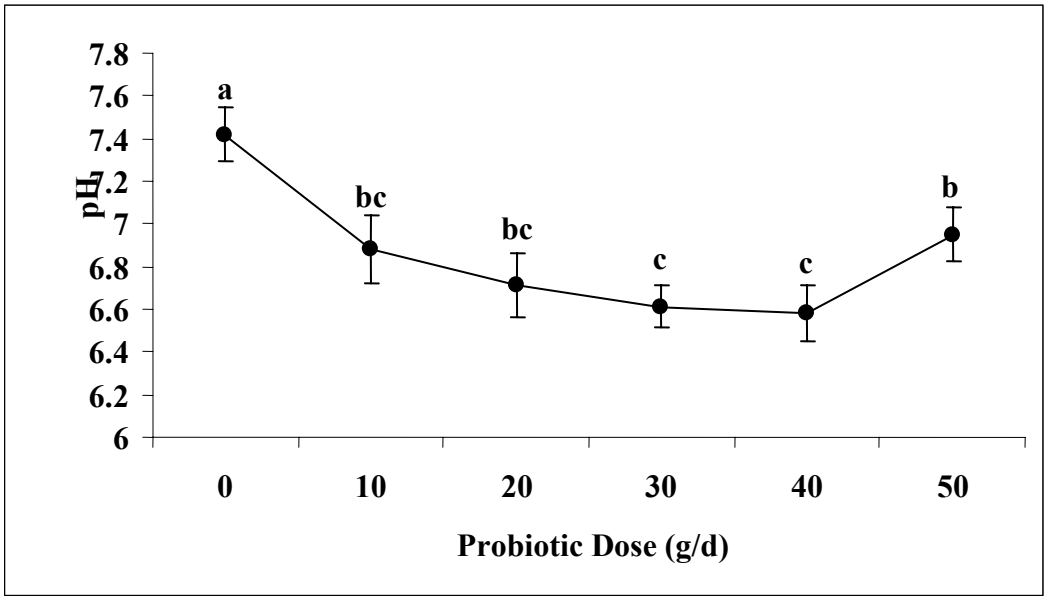
3.1. חלק א'

כדאי לפתוח את הפרק בתאור קצר של מה נעשה ואיך לטובת הבלתי בקיאים

3.1.1. pH

התוצאות מוצגות בגרף מס' 3. כפי שניתן לראות, מדד החומציות(תגדיר מה זה מדד החומציות ומה זה כל נקודה בגרף מבחינת זמו 14 יום כל ריכוז) היה הגבוה ביותר בתקופת הביקורת (טיפול 0 גר' תוסף פרוביוטי ליום) ועמד על 7.42 בממוצע.

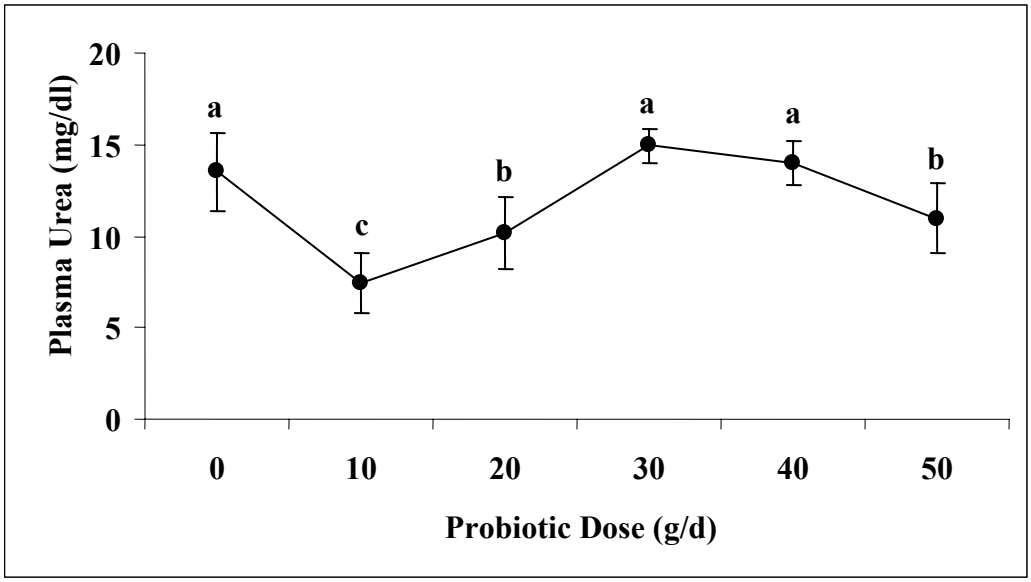
מדד החומציות היה הנמוך ביותר בתום תקופות טיפול 30 ו- 40 גר' תוסף פרוביוטי ליום (6.61, 6.85 בהתאמה). השפעת הטיפול הנה מובהקת סטטיסטית (*P*< 0.05 ; SEM=0.153) לא היה הבדל בין הכבשים, וכן , לא הייתה השפעה לזמן לקיחת הדוגמא.



גרף מספר 3- השפעת תוסף פרוביוטי על מדד החומציות בכרס
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק *P*< 0.05

3.1.2. שתנן בפלסמה

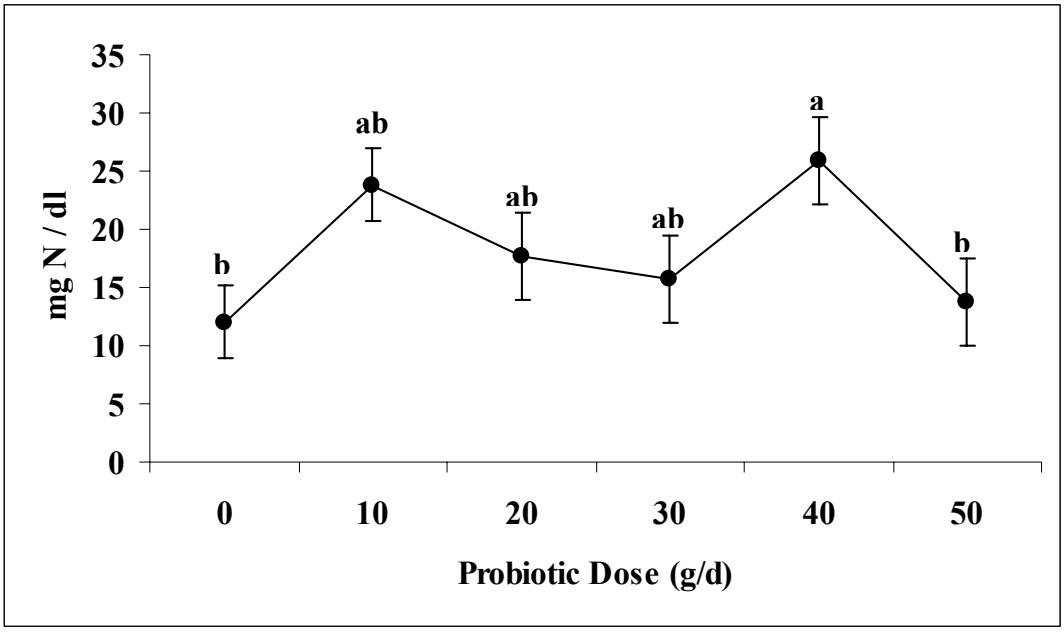
מהתוצאות המוצגות בגרף מס' 4 ניתן לראות שהערכים הגבוהים ביותר של שתנן בפלסמה התקבלו בתום תקופת הביקורת (13.51 mg/dl) וכן- בתום תקופות טיפול 30 ו- 40 גר' תוסף פרוביוטי ליום (14.00, 14.95 mg/dl בהתאמה). הערך הנמוך ביותר התקבל בתום תקופת טיפול 10 גר' ליום תוסף פרוביוטי (7.40 mg/dl). השפעת הטיפול הנה מובהקת סטטיסטית (*P*< 0.05 ; SEM=0.74). לא היה הבדל בין הכבשים, וכן , לא הייתה השפעה לזמן לקיחת הדוגמא.



גרף מספר 4- השפעת תוסף פרוביוטי על רמת השתנן בפלסמה
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק $P< 0.05$

3.1.3. אמוניה במיץ כרס

מהתוצאות המוצגות בגרף מס' 5. נראה שרמת האמוניה הושפעה מן הטיפול ($P< 0.05$; SEM=5.32). הערך הגבוה ביותר של אמוניה התקבל בתום תקופת טיפול 40 גר' תוסף פרוביוטי ליום ועמד על 25.86 mg N / dl . לעומת ערכי 12.00 mg N / dl, 13.73 שהתקבלו בתום תקופות ביקורת ו- 50 גר' תוסף פרוביוטי ליום בהתאמה. לא היה הבדל בין הכבשים, וכן , לא הייתה השפעה לזמן לקיחת הדוגמא.



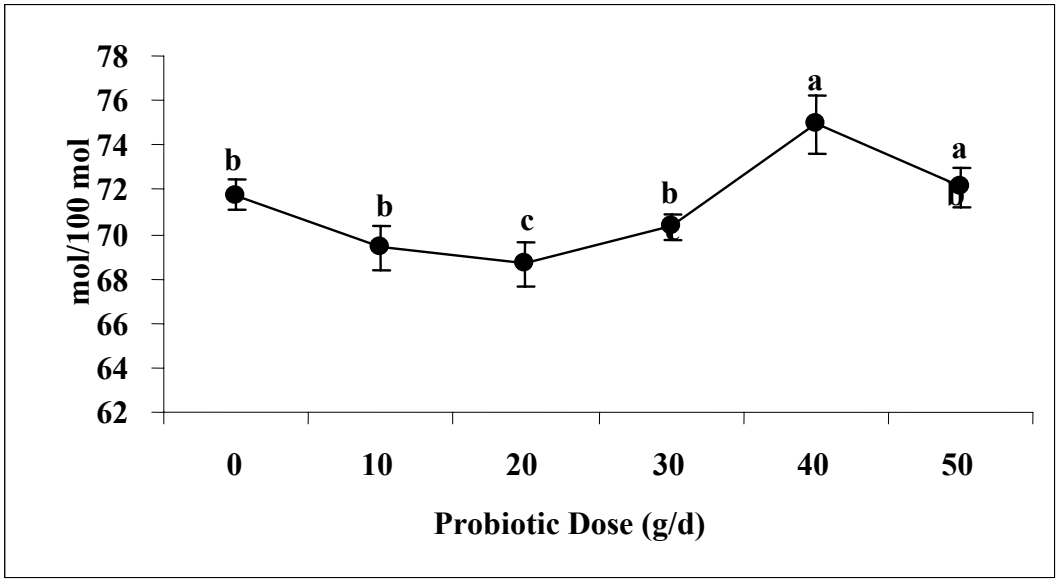
גרף מספר 5- השפעת תוסף פרוביוטי על רמת האמוניה במיץ כרס
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק $P< 0.05$

3.1.4. חומצות שומן נדיפות במיץ כרס

בכל הבדיקות לא נמצא הבדל בין הכבשים וכן לא הייתה השפעה של זמן לקיחת הדוגמא.

חומצה אצטית C2 – גרף מס' 6

טיפול בפרוביוביטיקה העלה את רמת החומצה האצטית באופן מובהק בכרס הכבשים (: $P< 0.05$ SEM=1.40). הערך הגבוה ביותר התקבל בתום תקופת טיפול 40 גר' תוסף פרוביוטי ליום ועמד על 74.91% מתוך סך חומצות השומן הנדיפות שנמצאו.

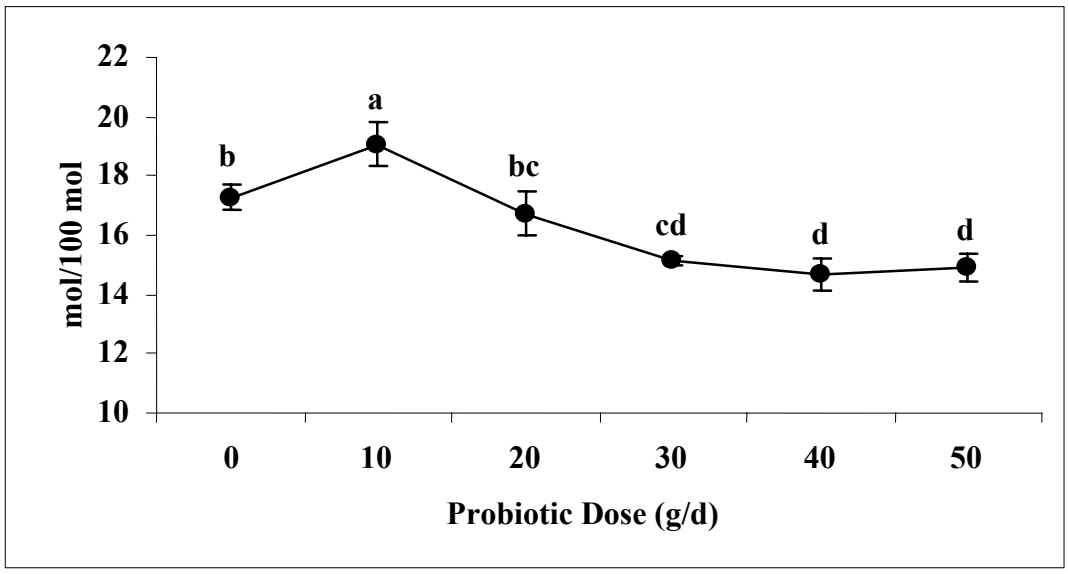


גרף מספר 6- השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה אצטית במיץ כרס
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק, $P< 0.05$

זה כדי שלא ישעמם הcut & paest

חומצה פרופיונית C3 – גרף מס׳ 7

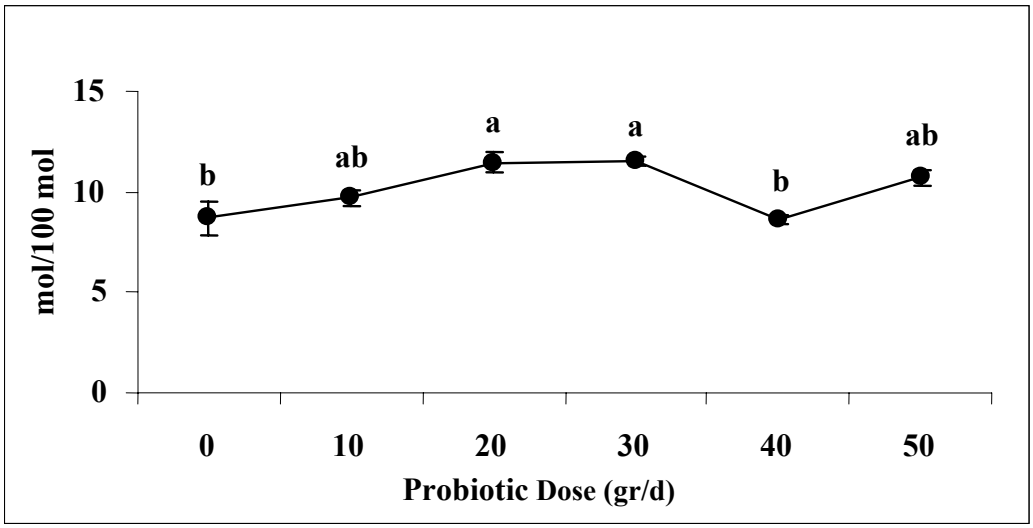
לטיפול הפרוביוטי הייתה השפעה מובהקת על הימצאות חומצה זו בכרס הכבשים ($P< 0.05$:SEM=0.539). הערך הגבוה ביותר התקבל בתום תקופת טיפול 10 גר׳ תוסף פרוביוטי ליום ועמד על 19.06% מתוך סך חומצות השומן הנדיפות, לעומת 14.92%, שנמצאו בתום תקופת 50 גר׳ ליום תוסף פרוביוטי.



גרף מספר 7- השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה פרופיונית במיץ כרס
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק, $P< 0.05$

חומצה בוטירית C4– גרף מס׳ 8

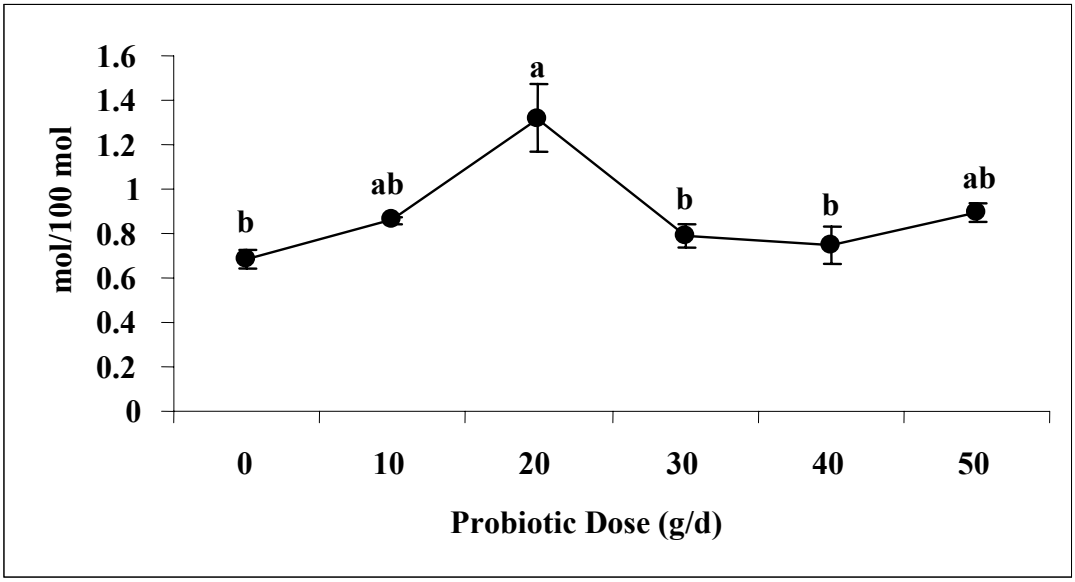
לטיפול הייתה השפעה מובהקת על הימצאות חומצה זו בכרס הכבשים ($P< 0.05$:SEM=1.025). אחוז החומצה הבוטירית מתוך סך כל חומצות השומן הנדיפות עלה מ- 8.7% בתקופת הביקורת (טיפול 0 גר׳ תוסף פרוביוטי ליום) ל- 11.56%, 11.44 שהתקבלו בתום תקופות טיפול 30 ו- 20 גר׳ תוסף פרוביוטי ליום בהתאמה.



גרף מספר 8- השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה בוטירית במיץ כרס
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק, $P< 0.05$

חומצה ואלרית C5 – גרף מס׳ 9

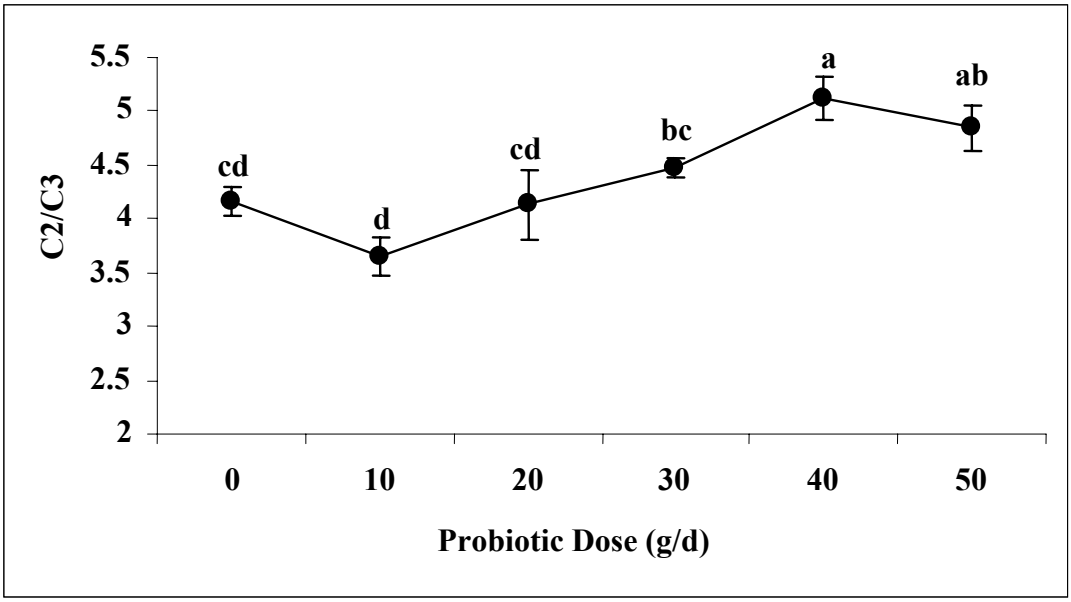
לטיפול השפעה מובהקת על הימצאות חומצה זו בכרס הכבשים ($P< 0.05$: SEM=0.245).



גרף מספר 9- השפעת תוסף פרוביוטי על אחוז מולרי של חומצה ואלרית במיץ כרס
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק, $P< 0.05$

יחס חומצה אצטית / פרופיונית– גרף מס׳ 10

לטיפול הייתה השפעה מובהקת על היחס החומצות בכרס הכבשים ($P< 0.05$; SEM=0.21) כאשר היחס הגבוה ביותר התקבל בתום תקופת טיפול 40 גר׳ תוסף פרוביוטי ליום ועמד על 5.11.



גרף מספר 10- השפעת תוסף פרוביוטי על היחס חומצה אצטית /פרופיונית במיץ כרס

קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק, $P< 0.05$

3.1.5. Real Time RT-PCR

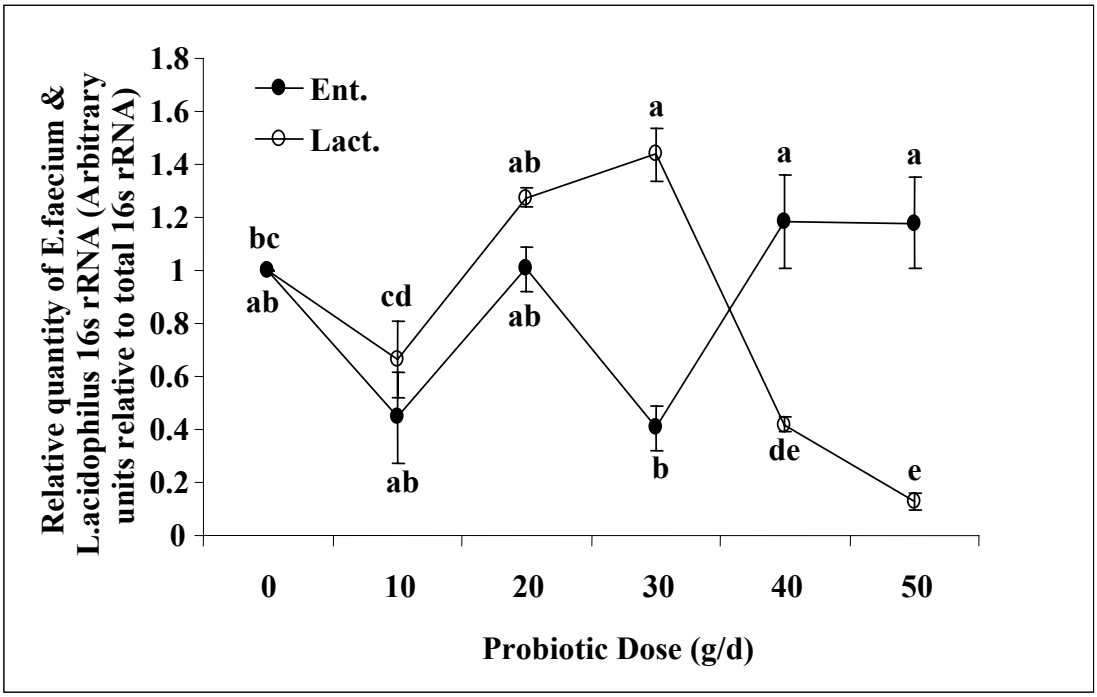
עוד פעם הקדמה קצרה על הנעשה והסבר יותר ברור של מה נבדק מי עלה איך ולמה....

העשרת E.faecium ו- L.acidophillus במיץ כרס וצואה כפי שבאה לידי ביטוי בבדיקת Real time PCR - גרפים 11,12.

נצפתה העשרת 2 זני החיידקים במיץ כרס (גרף מס' 11) אולם לא בתגובת dose-response. הערך הגבוה ביותר בהעשרת L.acidophillus התקבל בתום תקופת טיפול 30 גר' תוסף פרוביוטי ליום ועמד על 1.44±0.1 כאשר בתום תקופות הטיפול של 40 ו- 50 גר' תוסף פרוביוטי ליום, ערכי ההעשרה ירדו מאד ועמדו על 0.42±0.03 ועל 0.13±0.03 בהתאמה. השפעת הטיפול הייתה מובהקת סטטיסטית ($P< 0.05$; SEM=0.075).

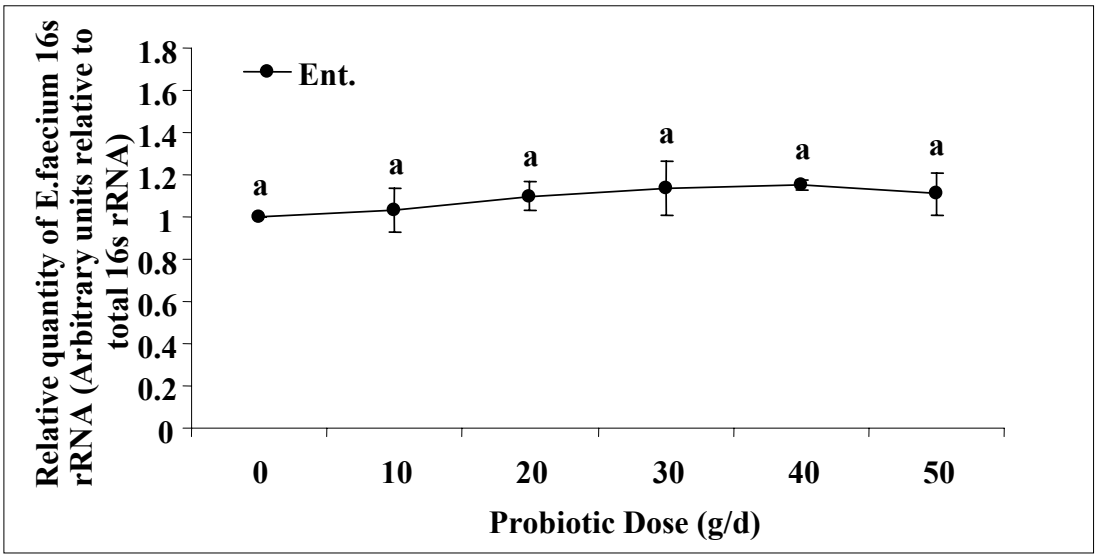
בהעשרת E.faecium, בתום תקופת טיפול 30 גר' תוסף פרוביוטי ליום התקבל הערך הנמוך ביותר 0.405±0.085, אך לאחר מכן נצפתה עלייה שבאה לידי ביטוי בתום תקופות הטיפול של 40 ו- 50 גר' תוסף פרוביוטי ליום (1.185±0.175 ו- 1.170±0.170 בהתאמה). השפעת הטיפול הייתה מובהקת ($P< 0.05$; SEM=0.131).

בבדיקת Real time PCR בצואה (גרף מס' 12) לא נמצאה העשרה של L.acidophillus ואילו העשרת E.faecium לא הושפעה מתוספת התוסף הפרוביוטי, ונשארה קבועה לכל אורך הניסוי ($P< 0.76$; SEM=0.08).



גרף מספר 11- העשרת E.faecium ו- L.acidophilus במיץ כרס

כפי שבאה לידי ביטוי בבדיקת Real-Time RT-PCR.
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק, $P< 0.05$



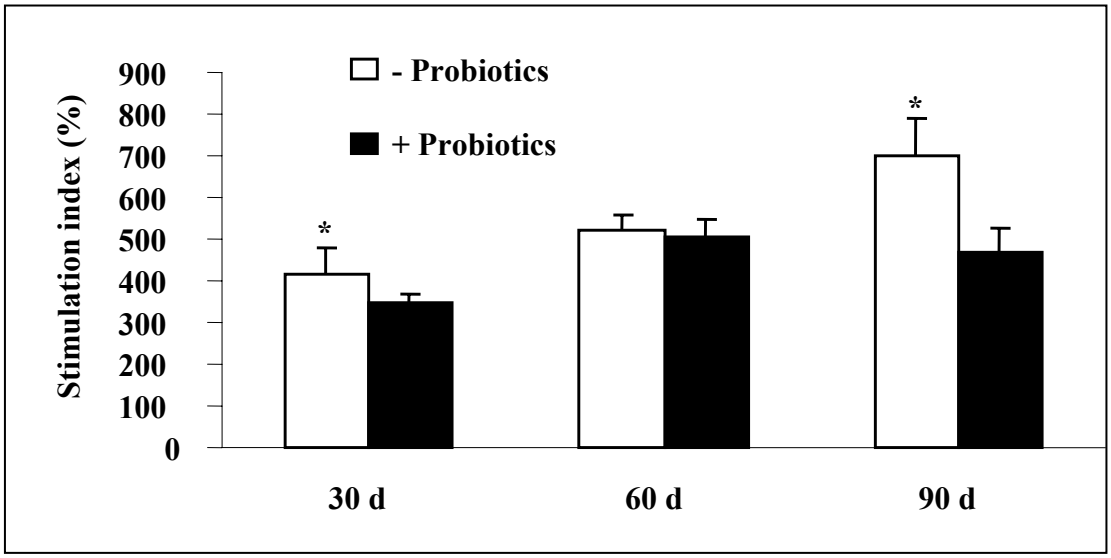
גרף מספר 12- העשרת E.faecium בצואה
כפי שבאה לידי ביטוי בבדיקת Real-Time RT-PCR.
קבוצות שאינן מסומנות באותיות זהות, שונות זו מזו באופן מובהק, $P< 0.05$

3.2. חלק ב'

הקדמה קצרה שכאן זה ניסוי בגדיים

3.2.1. פרוליפרציית לימפוציטים

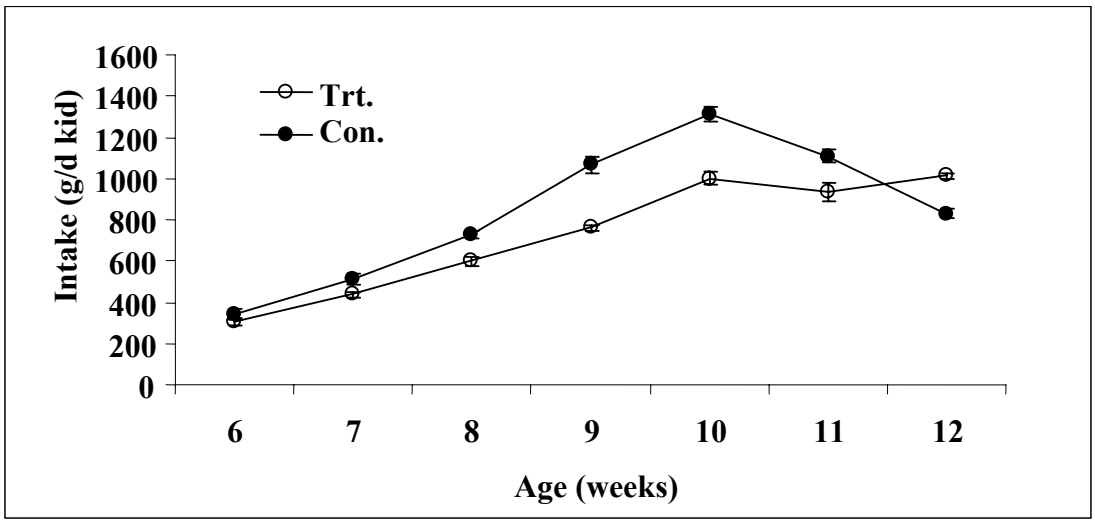
חלוקת התאים תוארו כאינדקס הגירוי שהוא הערך היחסי של מספר התאים לפני ואחרי הגירוי ב- con A. התוצאות מוצגות בגרף מס' 13. בגיל 30 ו- 90 יום הערך היחסי היה גבוה יותר בגדיים שלא קיבלו את התוסף הפרוביוטי ($P< 0.05$; SEM=0.49), גם לגיל הייתה השפעה חיובית על התגובה ($P< 0.05$).



גרף מספר 13- השפעת אנטיגן concanavalin A על חלוקת תאי לימפוציטים שהופקו מדמים של גדיים שגודלו עם או בלי תוסף פרוביטי עד גיל 16 שבועות. עמודות מסומנות בכוכבית נבדלו באופן מובהק $P< 0.05$.

3.2.2. צריכת מזון מרוכז

התוצאות המוצגות בגרף מס׳ 14. מראות כי לטיפול הייתה השפעה על צריכת המזון המרוכז: גדיים בקבוצת הטיפול שקיבלה את התוסף הפרוביוטי, נטו לאכול פחות מזון מרוכז מאשר בקבוצת הביקורת.



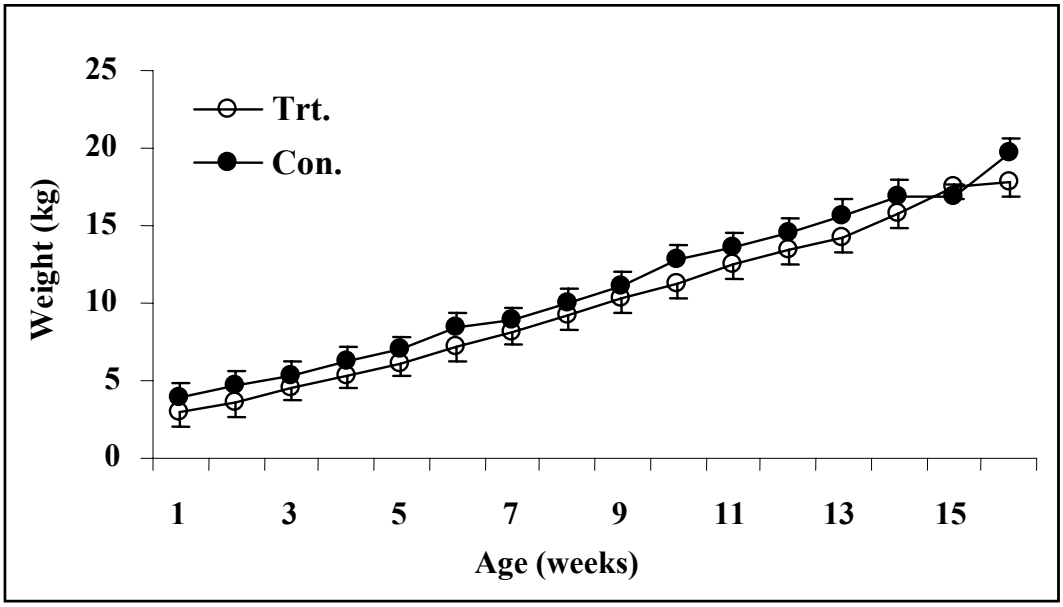
גרף מספר 14– צריכת מזון מרוכז על ידי 2 קבוצות הגדיים בגיל 6-12 שבועות

3.2.3. גדילה ומצב בריאותי

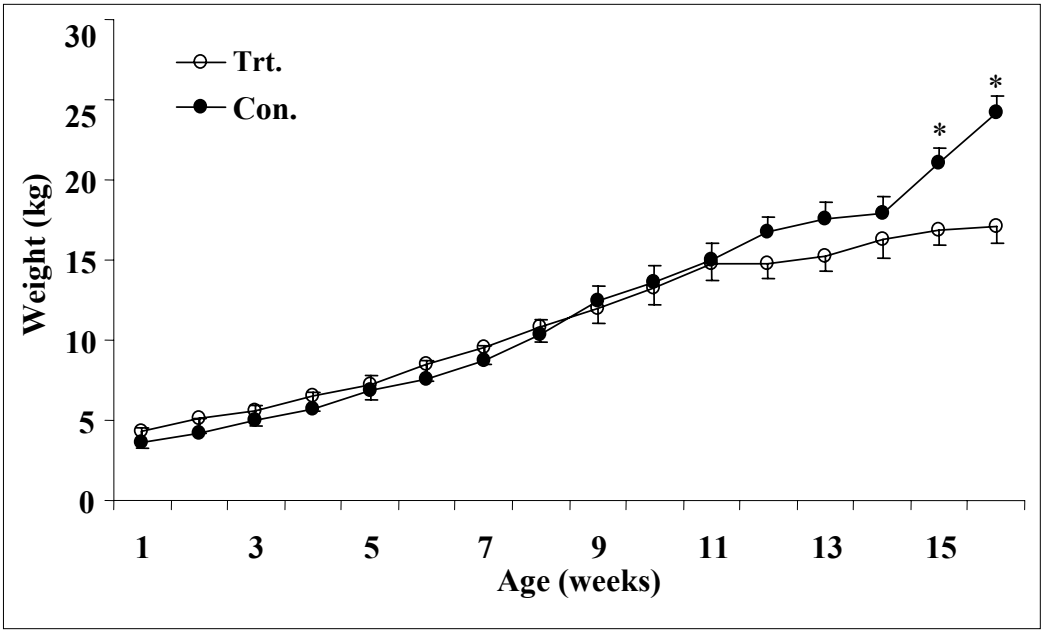
התוצאות מוצגות בגרפים 15-16 (15- גדיות, 16 – גדיים) מכיוון שהיו הבדלים מובהקים במשקלים וקצבי גדילה בין המינים ($P< 0.05$).

משקלי גוף הגדיות דמו בין שתי קבוצות הניסוי. משקל גוף ממוצע של הגדיות בגיל 16 שבועות היה 1.21 ± 17.2 ק״ג. מאידך גדיים בקבוצת הביקורת גדלו טוב יותר ($P< 0.05$) לעומת קבוצת הטיפול עם התוסף הפרוביוטי. משקל גוף סופי היה 1.23±24.2 ק״ג לקבוצת הביקורת בהשוואה ל- 1.07± 17.12 ק״ג לקבוצת הטיפול. מימד המאפשר נטרול השפעת משקל התחלתי על משקל סופי הנו קצב גדילת הגדיים לכל אורך תקופת הניסוי. גם במימד זה נצפו תוצאות דומות. (לא מופיע) קצב גדילת הגדיים בקבוצת הביקורת היה הגבוה ביותר 139 גר׳/יום, לעומת 122 גר׳/יום בגדיים בקבוצת הטיפול ($P< 0.05$). בשתי קבוצות הגדיות לא נצפה הבדל בקצבי הגדילה: 123 ו- 115 גר׳/יום לקבוצת הביקורת ולקבוצת הטיפול, בהתאמה.

במשך השבועות הראשונים של הניסוי (עד שבוע 4) נצפו כאבי בטן בגדיים וגדיות הניסוי שצרכו התוסף הפרוביוטי. תופעות אילו הודגשו על ידי עמידה עם גב קעור, הפרשות רכות ובטן נפוחה.



גרף מספר 15– משקל גדיות בשתי קבוצות הטיפול עד גיל 16 שבועות
המשקלים דמו בין הקבוצות במשך תקופת הניסוי.



גרף מספר 16– משקל גדיים בשתי קבוצות הטיפול עד גיל 16 שבועות
המשקלים נבדלו בין שתי הקבוצות החל מהשבוע ה-15 , $P< 0.05$
משקלים המסומנים בכוכבית נבדלו באופן מובהק.

3.3. חלק ג'

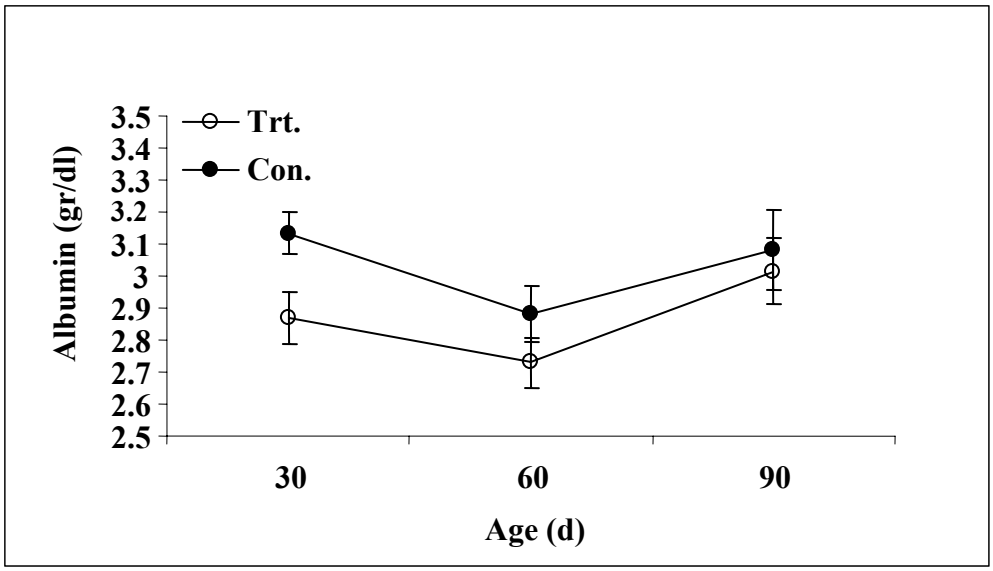
3.3.1. מדדים בפלסמה

בגיל 90, 60, 30 יום נלקחו דגימות דם מכל גדי, מן הוריד הג'גולרי. הדמים נלקחו למבחנות עם מונעי קרישה לבדיקת ערכים: אלבומין, N-אוריאה, גלוקוז, β–HB, וריכוז AST. בבחינת פרמטרים אלה נבחנה השפעת הטיפול, המין וגיל הגדיים והגדיות.
תוצאות בדיקות אילו מוצגות בגרפים 17-21. יפה....

כמתואר לעיל, בניסוי זה קבוצת הטיפול צרכה מזון גס באופן חפשי, בנוסף לקבלת התוסף הפרוביוטי בעוד שקבוצת הביקורת שאף היא קיבלה את התוסף, הוגבלה בצריכת מזון גס לגדי 60 גר' לגדי ליום.

אלבומין

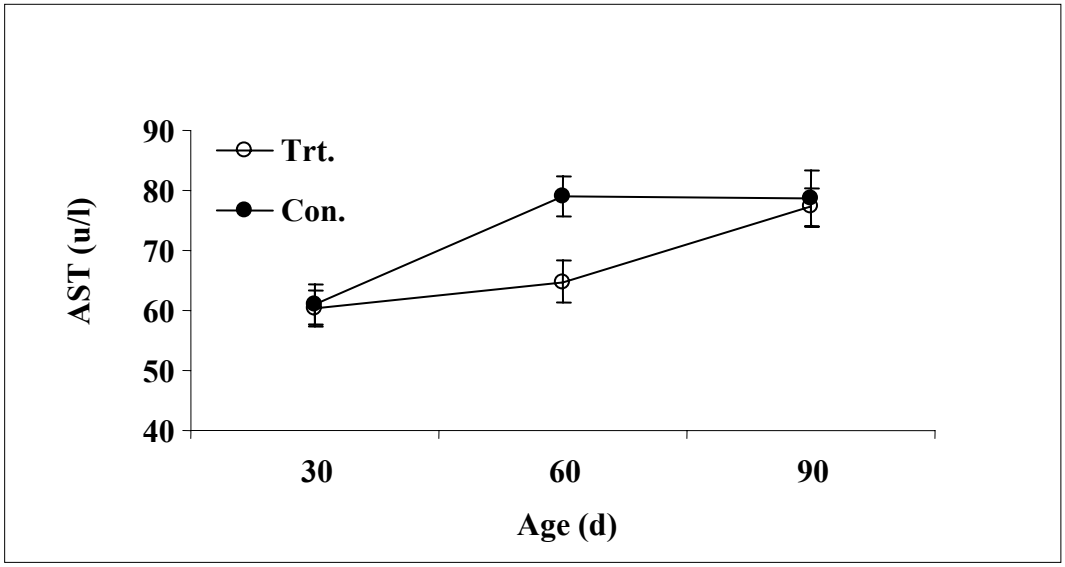
התוצאות מוצגות בגרף מס' 17. בבחינת רמת אלבומין נצפתה השפעה לטיפול ($P< 0.05$; SEM=0.066) כאשר בקבוצת הטיפול הערך הממוצע היה נמוך יותר ועמד על 2.875±0.052 g/dl בעוד שבקבוצת הביקורת מדובר בערך 3.033±0.056 gr/dl. כמו כן גם לגיל הגדיים הייתה השפעה ($P< 0.05$): רמת אלבומין בגיל 60 יום הייתה הנמוכה ועמדה על 2.8±0.06 gr/dl לעומת רמות האלבומין שבגילאים 30 ו- 90 יום שעמדו על 3±0.06 gr/dl, 3±0.077 gr/dl בהתאמה. מאחר ואלבומין מיוצר בכבד, ערכי אלבומין נמוכים מהנורמאלי עלולים להעיד על מחלת כבד או על מחלת כליות המאפשרת לאלבומין להיות מופרש עם השתן וכן על חוסר בברזל, חום או שלשולים. בניסוי זה התקבלו ערכים בטווח: 2.4-4.4 mg/dl הנורמאלי לעזים.



גרף מספר 17– השפעת הטיפול על רמת האלבומין בפלסמה מהמלטה עד גיל 90 יום.

Aspartate aminotransferase – AST

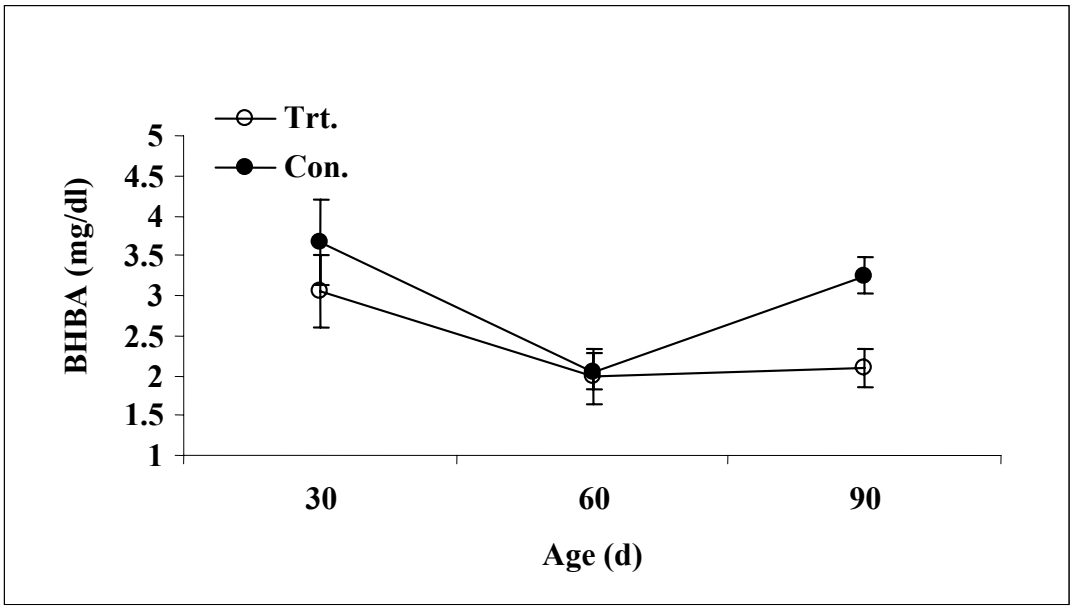
התוצאות מוצגות בגרף מס' 18. בבחינת רמת AST ניכר כי לטיפול (SEM=2.50; $P< 0.05$) למין ($P< 0.05$) ולגיל ($P< 0.05$) היו השפעה. ערך AST בגדיות היה גבוה יותר ועמד על 73.08±2.0 u/l בעוד שבגדיים היה 66.89±2.13 (לא מוצג). בגיל 30 יום היה ערך AST נמוך יותר ועמד על 60.94±2.15 u/l לעומת 77.78±2.67 u/l ו- 71.23±3.13 u/l בגיל 90 ו- 60 יום, בהתאמה. כמו כן ערכי AST בקבוצת הביקורת היו גבוהים יותר מאשר בקבוצת הטיפול בגיל 60 יום ועמדו על 79±3.41u/l לעומת 64.74±3.53u/l. עליה בערכי AST משמשת בראש ובראשונה לאבחון ומעקב אחר מחלות כבד שכן אילו יגרמו לשחרור מוגבר של AST מן הכבד. רמות AST בגדיים היו תקינות שכן בניסוי התקבלו ערכים בטווח: 66-230 u/l הנורמאלי לעזים.



גרף מספר 18– השפעת הטיפול על רמת AST בפלסמה מהמלטה עד גיל 90 יום.

β-hydroxybutirate

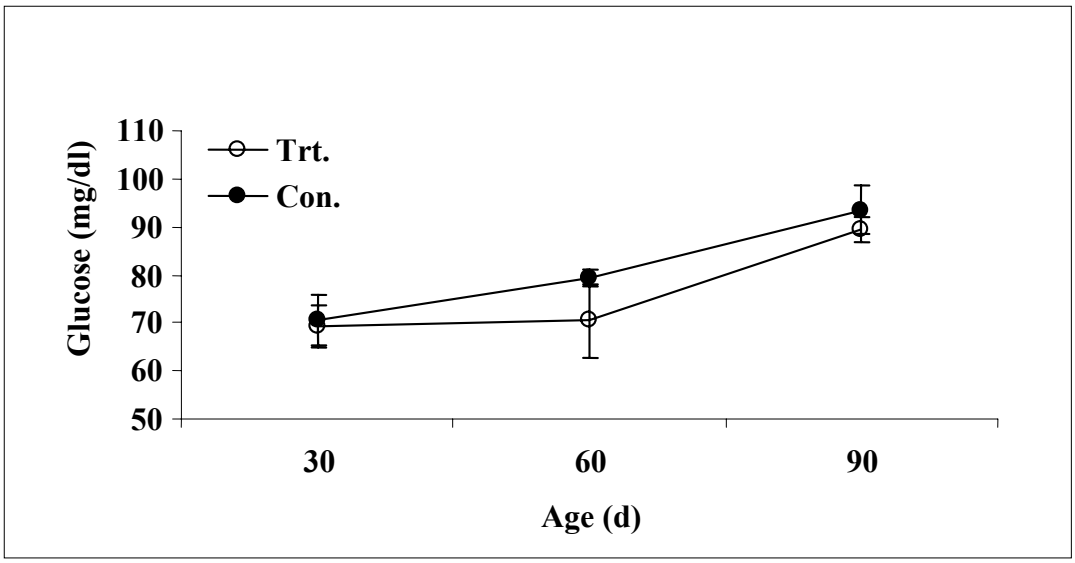
התוצאות מוצגות בגרף מס' 19. בחינת רמות β-hydroxybutirate הראתה כי לגיל בלבד הייתה השפעה ($P< 0.05$; SEM=0.26): בגיל 30 יום התקבל ערך ממוצע של 3.33±0.34 mg/dl, בגיל 60 יום התקבל הערך 2.04±0.21 mg/dl ואילו בגיל 90 יום התקבל הערך 2.67±0.23 mg/dl. ערכים גבוהים עלולים להעיד על אנורמאליות מטבולית או תזונתית (כבד שומני, רעב, קטוזיס וכד'). בניסוי זה התקבלו ערכים בטווח: 4.2 mg/dl הנורמאלי לעזים.



גרף מספר 19– השפעת הטיפול על רמת β- hydroxybutirate בפלסמה מהמלטה עד גיל 90 יום.

גלוקוז

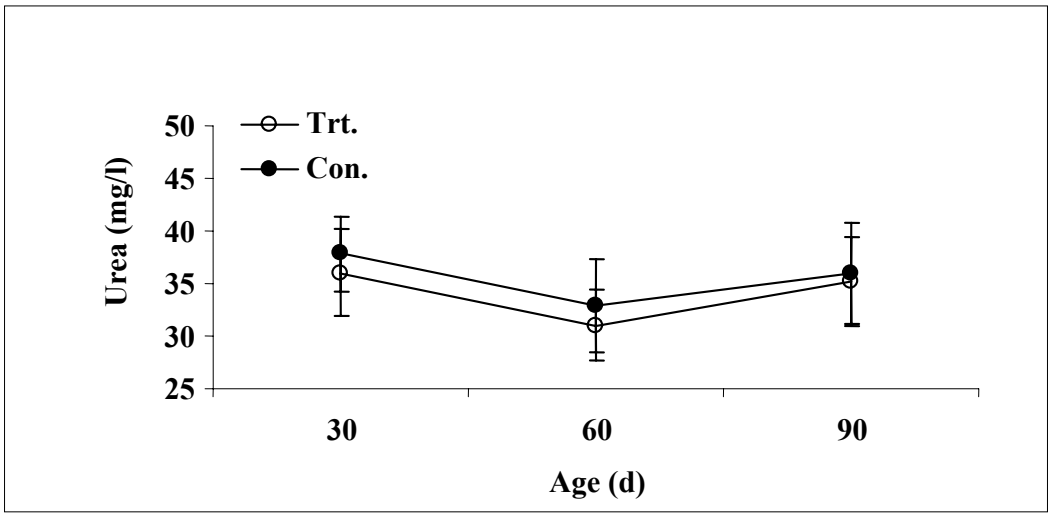
התוצאות מוצגות בגרף מס' 20. בחינת גלוקוז הראתה כי לגיל בלבד הייתה השפעה (P< 0.05 ; SEM=3.47): בגיל 90 יום התקבל הערך הגבוה ביותר 91.30±2.65 mg/dl שהיה שונה באופן מובהק מן הערכים בגילאי 60 ו-30 יום שעמדו על 74.57±4.33 mg/dl, 69.93±3.17 mg/dl בהתאמה. בניסוי זה התקבלו ערכים בטווח: 60-100 mg/dl הנורמאלי לעזים.



גרף מספר 20– השפעת הטיפול על רמת הגלוקוז בפלסמה מהמלטה עד גיל 90 יום.

חנקן אוריאה

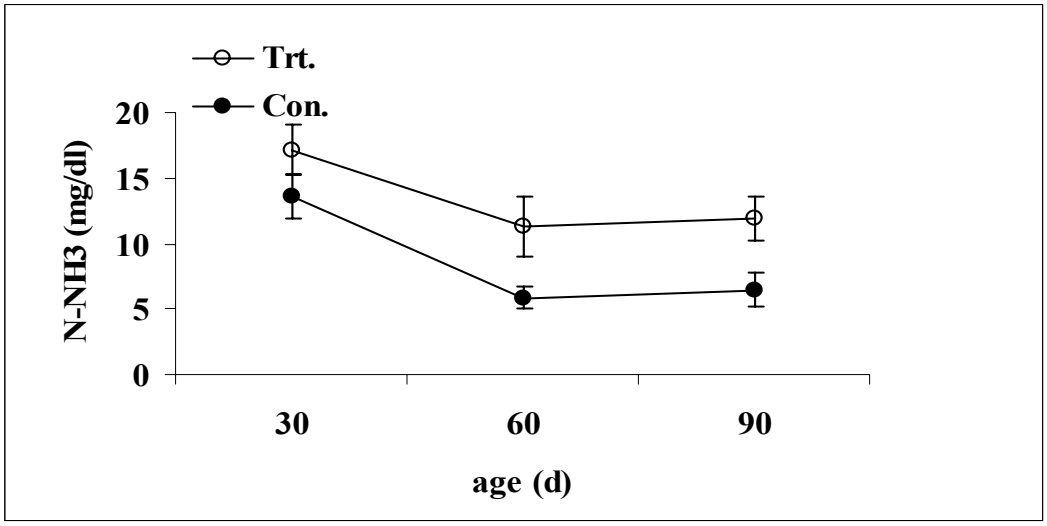
התוצאות מוצגות בגרף מס' 21. רמת האוריאה לא השתנתה לכל אורך הניסוי (P> 0.74; SEM=2.75). ערכי האוריאה בניסוי עמדו על 34.77±1.60 mg/dl לכל אורכו. זהו מדד המייצג את מאזן החלבונים במנה שכן פסולת עודפת (חנקן) מחלבונים מזונים הופכת לאוריאה בכבד וזו מופרשת בשתן. בניסוי זה התקבלו ערכים בטווח: 12.6-28 mg/l הנורמאלי לעזים.



גרף מספר 21– השפעת הטיפול על רמת האוריאה בפלסמה מהמלטה עד גיל 90 יום.

3.3.2. אמוניה במיץ כרס

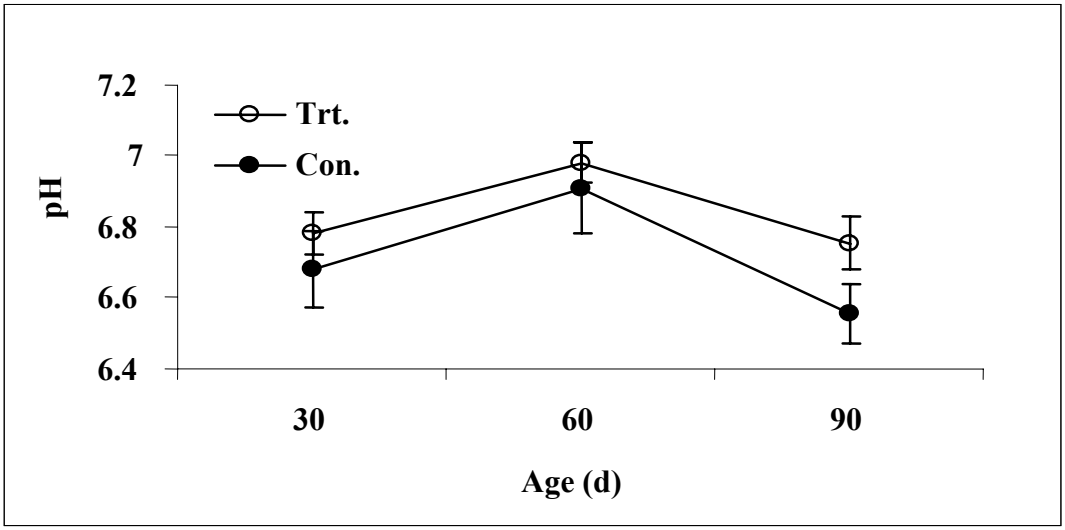
התוצאות מוצגות בגרף מס' 22. רמות האמוניה הושפעו מהטיפול ומגיל הגדיים. בקבוצת הטיפול שצרכה מזון גס באופן חופשי נצפו רמות אמוניה גבוהות יותר באופן משמעותי ($P< 0.05$; SEM=1.23) שעמדו על 13.43 ±0.99 mg/dl לעומת 8.6±1.08 mg/dl בקבוצת הביקורת. בגיל 30 יום רמות האמוניה במיץ כרס שנלקח מן הגדיים היה משמעותית גבוה יותר ($P< 0.05$; SEM=1.23) מאשר זה שנמצא במיץ כרס בגילאים 60 ו- 90 יום ועמד על 15.33±1.18 mg/dl לעומת 8.55±1.29 mg/dl ו- 9.17±1.34 mg/dl בהתאמה.



גרף מספר 22– השפעת הטיפול על רמת האמוניה במיץ כרס מהמלטה עד גיל 90 יום.

3.3.3. pH במיץ כרס.

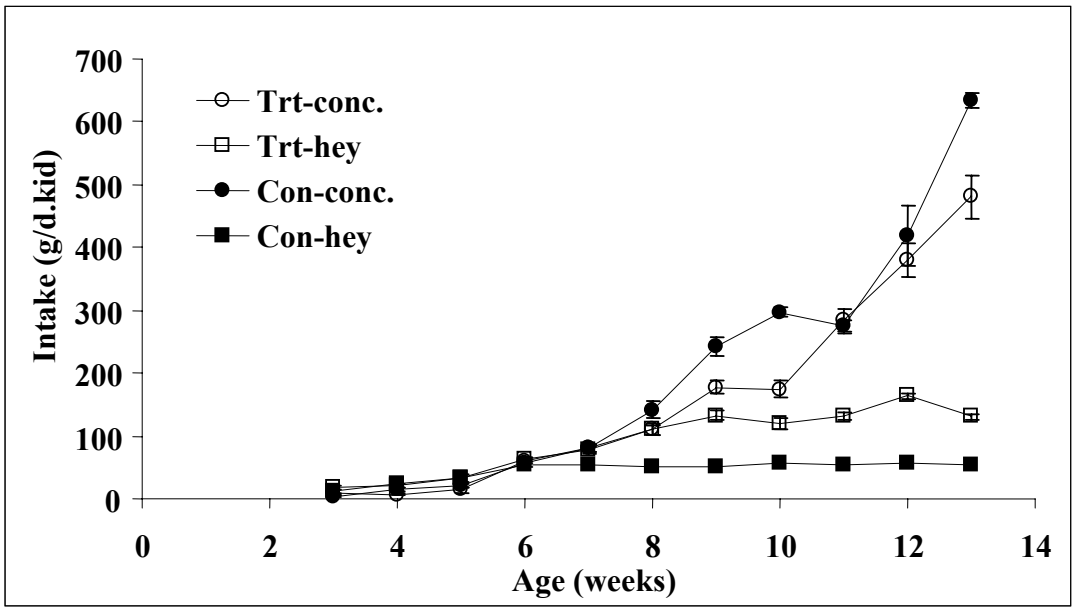
התוצאות מוצגות בגרף מס' 23. ה- pH בכרס הושפע מגיל הגדיים ומינם. בגיל 60 יום היה ה- pH בכרס הגדיים גבוה באופן מובהק מאשר זה שנמצא בכרס בגיל 30 ו- 90 יום ועמד על 6.94±0.55 לעומת 6.73±0.55 ו- 6.65±0.55 בהתאמה. היה הבדל גם בין הזכרים לנקבות: אצל הזכרים ממוצע pH בכרס עמד על 6.7±0.047 ואצל הנקבות ממוצע ה- pH עמד על 6.84±0.047 (לא מופיע) ($P< 0.05$; SEM=0.055).



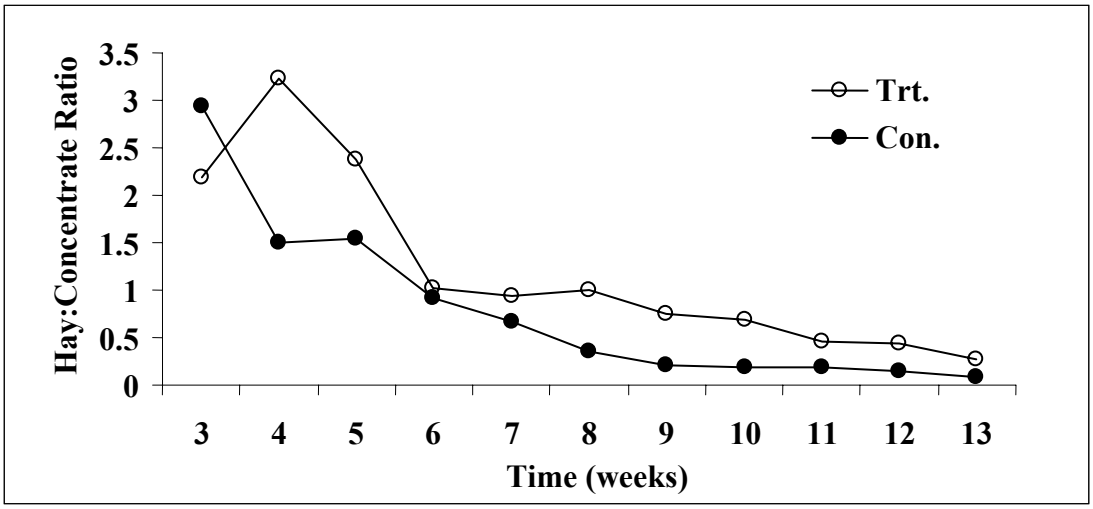
גרף מספר 23– השפעת הטיפול על מדד החומציות בכרס מהמלטה עד גיל 90 יום.

3.3.4. צריכת מזון

התוצאות מוצגות בגרף מס' 24. ניתן לראות כי עד שבוע שביעי לערך, צריכות המזון, המרוכז והגס הנן דומות בשתי הקבוצות. משבוע שמיני ועד שבוע 13 ניתן לצפות במגמה שבה קבוצת הטיפול, שקיבלה מזון גס באופן חפשי צורכת יותר מזון גס (131.28 גר'/יום/גדי בממוצע), ובמקביל מקטינה את צריכת המזון המרוכז, לעומת קבוצת הביקורת, שכאמור, הוגבלה בכמות המזון הגס שהורשתה לצרוך. בגרף מס' 25 מוצג אופן השתנות היחסים במנה בין שחת למזון מרוכז ב- 2 קבוצות הגדיים עם התקדמות הניסוי.



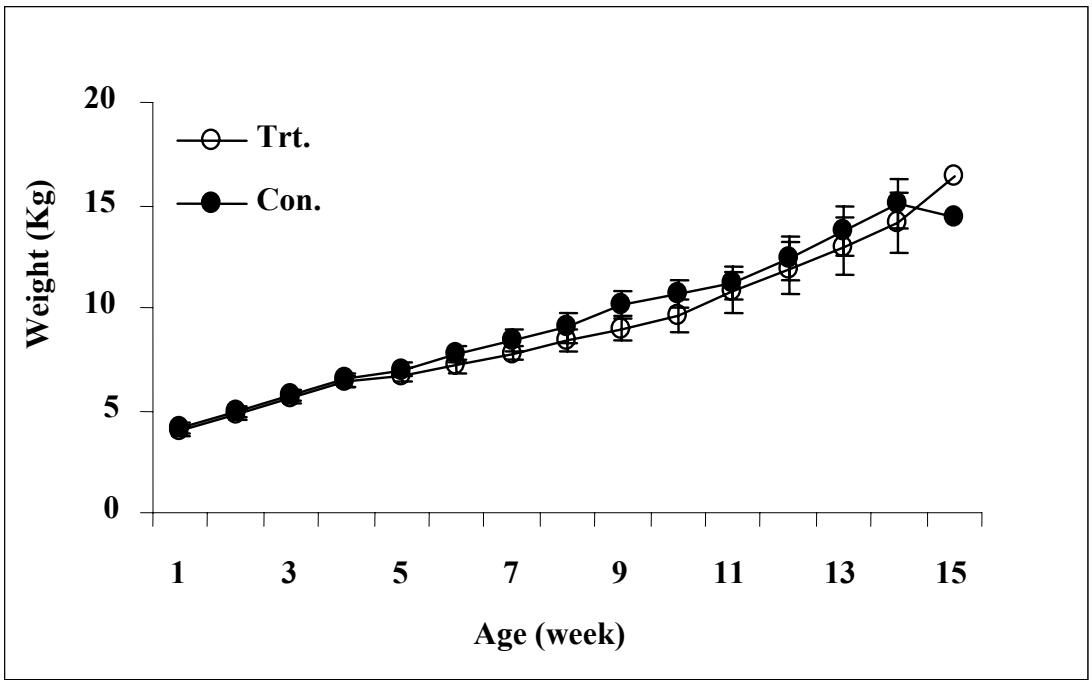
גרף מספר 24– צריכת מזון גס (hey) ומרוכז (.conc)
על ידי 2 קבוצות הגדיים בגיל 3-13 שבועות.



גרף מספר 25– יחס שחת:מזון מרוכז במנת הגדיים בגיל 3-13 שבועות
ב- 2 קבוצות הניסוי.

3.3.5. גדילה (משקל)

התוצאות מוצגות בגרף מספר26 . חלה עלייה לינארית במשקל הגדיים, עם התקדמות הניסוי. לא נמצא הבדל בין הקבוצות.



גרף מספר 26– משקלי שתי קבוצות הטיפול עד גיל 15 שבועות
המשקלים דמו בין שתי הקבוצות במשך כל תקופת הניסוי.

4. דיון

4.1 חלק א'

ניסוי In vivo התבצע בשני כבשים מקונלים. בוצעה בדיקת הישרדות והעשרת זני לקטובצילוס ואנטרוקוקוס בכרס, בתוספת כמויות הולכות ועולות (0-50 גרם, במרווחים של 10 גרם) של תכשיר פרוביוטי Fastrack® Probiotic Pack. תקופת טיפול ארכה 14 יום, ובסופה נלקחו דגימות מיץ כרס, צואה ודם.

הכבשים בניסוי היו מבוגרים יחסית אולם בריאים, ללא בעיות מיוחדות, שחיו על מנת קיום, והושתלה בהם קנולה בכרס. לפיכך לא נצפוי השפעות בריאותיות, בהשפעת התוסף הפרוביוטי, אלא רק על המדדים בכרס.

עם הוספת התוסף הפרוביוטי המכיל חיידקים מייצרי לקטאט (E. faecium ו- L. acidophilus) ציפינו, בהקשר לניסוי זה, לתוצאות כגון ירידה בפוטנציאל לאצידוזיס מטבולי, עליה בריכוז פרופיונאט בכרס, (Krehbiel, 2003). עליה ב-pH הנמדד בכרס, עם העלייה בכמות התוסף הפרוביוטי עקב הרגלת הסביבה של המק"א לנוכחות החומצה הלאקטית (Yoom & Stern, 1995). התוסף הפרוביוטי שקיבלו הכבשים הכיל בנוסף לחיידקים E. faecium ו- L. acidophilus גם שמרים מסוג Saccharomyces cerevisiae . דרכי פעילות השמרים בכרס הן: אספקת פקטורי גדילה, פרו-וויטמינים ו/או מיקרונוטריינטים המעודדים גדילת מק"א בכרס. השמרים מעודדים צמיחת בקטריות המנצלות חומצה לאקטית. רמת החומצה הלאקטית יורדת וכך יורדת גם החומציות תוך התאמת מיקרוסביבת הכרס לחיידקים מעכלי צלולוז, מה שאמור להביא לעלייה בעיכול סיבים, צריכת מזון ויצרנות. השמרים צורכים אמוניה וכן את מעט החמצן שבדפנות הכרס וכך מתאפשרת עלייה ביצור וביעילות המק"א המביא לעלייה ביצור וביעילות ניצול חלבון מק"א המביא לעליה בזרימת חומצות אמינו המגיעות לקיבה ולמעי (Miller-Webster et al., 2002). בניסוי In-vitro שערכו Miller–Webster וחובריו נמצא כי מתן חיידקים מסוג E.faecium בתוספת לשמרים מסוג S.cervisiae גרם לעלייה בפרקציה הפריקה במנה (עליה בנעכלות אספסת, וגרעיני תירס ושעורה), לעומת מנה שהכילה תוסף של E.faecium בלבד. מכאן נובע כי תוספת השמרים אמורה להעצים את השפעת החיידקים הפרוביוטים.

מבדיקות ה- Real time RT PCR עולה כי בכרס הייתה העשרה משתנה של E. faecium לאורך תקופות הניסוי ,אולם מתוך בדיקת ההעשרה כפי שנמדדה בצואה, נראתה תמונה שונה, שממנה עולה כי מידת העשרת אוכלוסיית חיידקים אילו לא השתנתה לאורך הניסוי במערכת העיכול התחתונה. ככל הנראה השפעת E. faecium הייתה אפקטיבית יותר בחלק העליון של איזור מערכת העיכול. ב- L. acidophilus נראו שינויים המעידים על השתנות ההעשרה במהלך הניסוי כבר בכרס, אולם רמתם בצואה הייתה מתחת לסף הזיהוי, ייתכן כי הסיבה לכך היא יכולתם המוגבלת להיצמד למוקוזת המעי הדק (גרף מס' 11,12). תוצאות אלו הן בהתאמה למחקר של Jin

et al.(2000): שהראות כי אדהזיה של E.faecium למוקוזת המעי הדק גבוהה יותר מאדהזיית L.acidophilus (9% לעומת פחות מ- 1.5%).

יש לזכור כי העשרה אינה מייצגת את האוכלוסייה הספציפית בכרס באופן כמותי (מספרי), וכן, היא אינה מעידה על מצב האוכלוסייה (תמותה). מדובר בשינויים (איכותיים) באוכלוסיה הספציפית, ביחס לאוכלוסיית החיידקים הכללית בכרס, וזו כזכור, תלויה במימדים כגון המצב הפיזיולוגי של המאכסן, בנוסף לנפח הכרס, קצב זרימת המעכל, מדד החומציות, נוכחות נוטריינטים וכד' (Tajima et al., 2001).

בכרס, לאחר 14 יום של מתן התוסף, (10 גר'/יום), העשרת החיידקים הייתה נמוכה יחסית לביקורת (0 גר'/יום). אולם לאחר מתן מנה של 20 גר'/יום נצפתה התאוששות אוכלוסיית החיידקים כאשר העשרת E. faecium הייתה גבוהה מאשר בביקורת ועלתה עוד יותר בתום תקופת 30 גר'/יום. העשרת E. faecium בתום תקופת 20 גר'/יום עדיין הייתה נמוכה מהביקורת, כאשר בתום תקופת 30 גר'/יום אוכלוסייה זו, ביחס לכלל המיקרופלורה בכרס ירדה שוב. עם זאת בתום תקופות 40 ו- 50 גר'/יום חלה התאוששות וניכרת העשרת אוכלוסיית E.faecium. זאת לעומת מידת העשרת אוכלוסיית L. acidophilus בכרס שדווקא הלכה והצטמצמה.

רמת העשרה הגבוהה ביותר של L. acidophilus נצפתה בתום תקופת טיפול של 30 גר'/יום תוסף פרוביוטי, במקביל עלתה החומציות בכרס, כמו גם האמוניה והשתנן בפלסמה (ראה המשך דיון).

מבחינת חש"ן: בתום תקופת טיפול של הוספת 30 ג'/יום תוסף פרוביוטי, האחוז היחסי של החומצה הפרופיונית והחומצה הוולרית היו בירידה, האחוז היחסי של החומצה האצטית עלה ואילו החומצה הבוטירית שמרה על רמה גבוהה כמו זו שנמדדה בתום תקופת הטיפול של 20 ג'/יום. בהמשך לכך היחס בין החומצה האצטית לפרופיונית גדלו גם כן. תוצאות אלו נמצאות בהתאמה לתוצאות ממחקרו של Weinberg et al. (2003), שהראו כי בתוספת L. plantarum ו- E. faecium למיץ כרס בצלחות, האחוז היחסי של פרופיונאט ירד ($P< 0.05$) ואילו של אצטאט עלה. מאידך הממצאים נראו בניגוד לתוצאה של Kim et al.(2000) אשר דיווחו על עליה בריכוז הפרופיונאט על חשבון ריכוז האצטאט בתוספת בקטריות המייצרות וצורכות לקטאט (L. plantarum, Pacidipropionici). היחסים בין חומצות השומן הנדיפות תלוי במיני המק"א ובתנאים השוררים בכרס. לרוב, ייצור חומצה פרופיונית מלווה גם בייצור חומצה אצטית ו- CO_2 (מסיבות סטוכיומטריות), כאשר למק"א שונים אפקטיביות שונה ביצירת פרופיונאט (Krehbiel et al., 2003; Kim et al., 2000).

בניסוי זה לא נצפתה תגובת dose response מבחינת חש"ן. לאחר מתן התוסף במינון של 10 גר'/יום לחיה, total VFA עלה ב- 60%, ככל הנראה עקב היווצרות מסלולי יצור חש"ן

אפקטיביים יותר, בהתאם לתוצאות מחקר של Varel and Kreikemeier משנת 1994: "ערכי Total VFA היו גבוהים יותר, וה- pH נטה להיות נמוך יותר, כאשר ניתנו במנה 27 גר'/יום תוצרי תסיסה של הפטרייה A.oryzae "

על פי Ghorbany et al. (2002) תופעה זו לכשעצמה (עליה ב- Total VFA) עלולה להביא לירידה ב- pH: "pH נמוך בכרס בפרים נבע בראש ובראשונה מהצטברות חש"ן, ולא מהצטברות לקטאט." ככל הנראה זה מה שקרה גם כאן: חומצות השומן הנדיפות הן חומצות חזקות יותר מהחומצה הלאקטית, ובזמן שיש עליה משמעותית ביצורן, החומציות בכרס עולה. כאמור, ה- pH הוא הנמוך ביותר בתום תקופות 30 ו- 40 גר'/יום, ובתום תקופת 50 גר'/יום הוא עולה מעט, אך עדיין לא מגיע לרמה מתום תקופת הביקורת: בשלב זה ערך Total VFA גבוה ב- 20% מאשר בתקופת הביקורת, וייתכן כי זו הסיבה לעליה האחרונה ב- pH הכרס.

בנוסף, נוכחות E. faecium מעלה יעילות המק"א המנצלים חומצה לאקטית (ומייצרים חומצה פרופיונית) ולכן, חלה גם עליה בחומצה פרופיונית (לא מופיע) ביחס לביקורת, וזאת בהתאם למחקרים של Beauchemin ו- Kim (Kim et al., 2000; Beauchemin et al., 2003). ????ניסוח מה הכוונה??

הכבשים בניסוי זה לא סבלו מאצידוזיס בשום שלב אולם ייתכן כי נוכחות E. faecium ו- L.acidophilus "מרגילים" את שאר הבקטריות לנוכחות חומצה לאקטית (Yoom and Stern, 1995. Ghorbani et al., 2002).

עליה בחנקן שתנן בפלסמה לאחר תוספת 30 ג'/יום תואמת גם היא את העלייה הצפויה ביעילות ייצור חלבון מק"א בכרס. רמת חנקן NH_3 בכרס לא הושפעה מהטיפול, בהתאם לתוצאות הניסוי של Ghorbani et al. (2002).

דרישות החנקן של המק"א בכרס קשורות לרמת האנרגיה במנה. רוב עיכול האנרגיה (מלבד שומן וחלק מהמינרלים) מתרחש בכרס. המק"א יכולים להפוך אנרגיה ממזון לחש"ן רק אם יש להם מספיק חנקן לצרכיהם המטבוליים. כלומר בע"ח החי ברמת קיום, כגון הכבשים שעליהם בוצע הניסוי, או ברמת יצרנות נמוכה מאד דורש יותר RDP (Rumen degraded protein), על מנת לוודא קיום תסיסה אופטימלית בכרס, בנוסף לדרישות חלבון לרקמה (קיום). ה- RDP הופך בכרס לאמוניה על ידי המק"א, תוך ייצור תוצרי לוואי – החש"ן. בשלב זה ריכוז האמוניה בכרס עולה ועובר את ריכוז האמוניה בדם, עד לנקודה שבה אמוניה עוברת את דפנות הכרס ונכנסת למערכת הדם. לכן, באופן נורמאלי, העלייה ברמת האמוניה בדם תופיע לאחר העלייה בכרס (Chamberlain & Wilkinson, 2002).

באופן מעשי, נלקחו 2 דגימות בכל "יום דגימות" שבתום תקופת הטיפול: בשעה 08:00, ובשעה 14:00. בחינה סטטיסטית הראתה כי לא הייתה השפעה לזמן לקיחת הדוגמאות. כלומר, בחינות המטבוליטים נעשו בו זמנית. בנוסף יש לזכור כי הכבשים בניסוי הוזנו באופן אוטומטי מאיבוס המאפשר להם לאכול מידי שעתיים, כך שלמעשה רמות המטבוליטים בדם הכבשים נשמרו קבועות יחסית. זו כנראה הסיבה לכך שלא נצפתה עלייה ברמת האמוניה בכרס ולאחריה עלייה בשתנן בדם, אלא נצפו למעשה עליות בו זמנית של שני מדדים אילו לאחר תקופת הניסוי שבה ניתן לכבשים 30 גר'/יום תוסף פרוביוטי.

4.2. חלק ב'

המיקרופלורה של מערכת העיכול במע"ג יונקים בגילאים 1-4 שבועות שונה מזו של מע"ג בגילאים מאוחרים יותר. בשלבי ההתפתחות הראשונים, המק"א השולטים בכרס הם: אצידופילים, קוליפורמים, לקטובצילים, מק"א מתסיס לקטוז ובאופן חלקי גם מק"א אנארובים מסוימים. עם הגיל, יש מעבר איטי למיקרופלורה האופיינית לכרס המפותחת של מע"ג בוגר (Agarwal et al., 2002).

כאמור, חלק זה של הניסוי בוצע במטרה להעריך תרומת תוספי מזון פרוביוטים (סדרת FASTRACK: Probiotic Pack, liquid dispersible, kick-of) לשיפור ביצועים איזה?? ומצב בריאותי של גדיים לפני ואחרי גמילה. למשך 90 יום נערך מעקב שבועי על גדילתם (משקל וקצב גדילה), מצבם הבריאותי וכן נערכה בדיקת פרוליפרצייה של לימפוציטים לבחינת המערכת החיסונית.

השפעה חיובית על הנעכלות, נצפתה בגדיות שקיבלו תוספת פרוביוטיקה שכן, הן צרכו פחות מזון מרוכז עד שבוע 11 (גרף מס' 14), אך הגיעו למשקל סופי, בשבוע 16, דומה למשקל הממוצע של הגדיות בקבוצת הביקורת (גרף מס' 15). זאת בדומה לתוצאות של Chang et al. (2001): "במונחים של צריכת מזון, קבוצות הפרוביוטיקה צרכו 11-34% פחות מאשר קבוצות הביקורת על מנת להגיע למשקל זהה". בזכרים לא ניכרת השפעה שכזו, מאחר והמשקל הסופי הממוצע של הזכרים בקבוצת הטיפול היה נמוך יותר מהמשקל הממוצע של הזכרים בקבוצת הביקורת (גרף מס' 14).

אם נבחן את העלייה במשקל גוף לאורך זמן, נראה כי בגדיים זכרים ממוצע המשקל בקבוצת הביקורת נטה להיות גבוה יותר בשבועות 12-14, ואילו רק בשבועות 15-16 הוא היה גבוה באופן מובהק מהממוצע בקבוצת הטיפול. נתונים אילו הם בדומה למחקרים אחרים שנעשו: על פי Morrill et al.(1994), וכן על פי Abu-Tarboush et al. (1996) לא היה הבדל מובהק מבחינת משקל גוף בין עגלים שקיבלו תוספת L. acidophilus לבין קבוצת ביקורת, שלא קיבלה. גם במחקר של Cruywagen משנת 1995, לא היה יתרון מובהק לקבוצה שקיבלה פרוביוטיקה: "לא נצפה אף הבדל משמעותי בין הטיפולים מבחינת משקל גוף לכל אורך הניסוי".

מבחינה בריאותית במשך השבועות הראשונים של הניסוי (עד שבוע 4) נצפו כאבי בטן לגדיים וגדיות הניסוי שצרכו התוסף הפרוביוטי. תופעות אילו הודגשו על ידי עמידה עם גב קעור, הפרשות רכות ובטן נפוחה. גם כאן, התוצאות בספרות אינן אחידות, נראה כי לתוספת פרוביוטיקה עלולה להיות השפעה חיובית (Fumiaki et al., 1995), חיובית חלקית (Abu-Tarboush et al., 1996) או שלא נצפתה השפעה כלל (Cruywagen et al., 1995. Morrill et al., 1994).

התפקיד העיקרי של מערכת העיכול הוא עיכול וספיגת נוטריינטים המאפשרים גדילה והתפתחות המאכסן. בנוסף, המוקוזה מהווה מחסום המגן על המאכסן מפני נוכחות מתמדת של אנטיגנים מהמזון בחלל המעי. מערך ההגנה כנגד מזיקים כולל פקטורים רבים כגון רוק, חומצות עיכול, פריסטלטיקה, מוצין, פרוטאוליזה, פלורת המעי וממברנה אפיתליאלית. שינוי דרסטי בתפקוד המחסום במעי חל בלידה במעבר מעיבוד נוזל אמניוטי לחלב, וצריכת מזון מהווה טריגר לשחרור הורמונים טרופיים ולאקטיבציית הפרשה, תנועתיות, ספיגה, הופעת חלבוני מוקוזה, אנזימי עיכול ומק"א. ביסוס פלורה נורמאלית במעי יכולה למנוע גדילת יתר של פתוגנים פוטנציאלים במעי (Isolauri et al., 2001).

תגובת תאי T כנגד אנטיגנים תלויה בסוג האנטיגן, בדרך הכניסה שלו ובכמותו. בנוסף יש חשיבות גם לגיל המאכסן ולמועד חדירת האנטיגן. עם החשיפה לאנטיגן תאי מערכת החיסון מגיבים בשחרור ציטוקינים המכוונים את המשך התגובה החיסונית. בבע"ח צעירים, המנגנונים להרחקת אנטיגנים במעי אינם מושלמים ויכולתם לייצר IgA מופחתת, כך שייתכן שתהיה חריגה במעבר אנטיגנים. גורמים אילו מסבירים את הפגיעות הרבה בגיל צעיר. ייצור לא מספק של חומרים אנטי-דלקתיים על ידי לימפוציטים גורם לרגישות יתר גם בחדירת רמות נמוכות של האנטיגן (Isolauri et al., 2001).

מיקרופלורת המעי מהווה מרכיב חשוב במחסום ההגנה ועוזרת גם בהבגרת מערכת החיסון באמצעות חשיפה מתאימה לאנטיגנים המאפשרת שיפעול תאים המייצרים IgA (Isolauri et al., 2001). סטאטוס מערכת החיסון נקבע לא רק על ידי הרכב תאי מערכת החיסון, אלא גם על ידי הפונקציות שהם ממלאים והאתגר המיקרוביאלי שהם מתמודדים עמו (Scharek et al., 2005). לדוגמא, L. acidophilus משרה פגוציטוזה מוגברת, וזו משפעלת תגובה דלקתית בשלב מוקדם, לפני תחילת ייצור הנוגדנים: הפגוציטים משחררים רעלנים ואילו מעודדים גיוס תאים אימונוקומפטנטים וייצור תגובה דלקתית (Isolauri et al., 2001).

על פי תוצאות מחקר זה, לימפוציטים שבודדו מגדיים שקיבלו תוסף פרוביוטי, היו בעלי יכולת מופחתת להגיב לאתגר אנטיגני במבחנה, בניגוד לתוצאה הצפויה: חיזוק מערכת החיסון (גרף מס' 11). כנראה בניסוי זה, מתן התוסף העשיר את מיקרופלורת המעי, ומנע או דיכא התפתחות חיידקים פתוגניים במערכת העיכול. לכן, מערכת העיכול הסיסטמית והמוקוזיאלית של גדיים אלו לא נחשפה לאתגרים מחלל המעי וזה התבטא בתגובה המופחתת של הלימפוציטים, כפי

שפורסם בכנס השנתי ה-17 למדעי הבקר בפוסטר "השפעת מתן תוסף פרוביוטי לגדיים מיד לאחר המלטה ועד גיל שלושה חודשים, על קצב גדילה ומטבוליטים בדם ובכרס".

תוצאות אילו הן בהתאם למחקר של Scharek et al. משנת 2005, שבו ניתן E. faecium לאמהות חזירות ולחזירונים מהמלטה ועד גיל 56 יום. במחקר זה ערכי Total IgG בסרום בקבוצת החזירונים שקיבלה פרוביוטיקה היו נמוכים באופן מובהק, כמו גם רמות תאי T ציטוטוקסים באפיתל הג'ג'ונום. חוקרים אלה הסיקו כי תופעה של דיכוי מערכת החיסון היא משנית לתופעה הראשונית של טיפול פרוביוטי שהיא השפעה על קולוניזציה של אנתרו-פתוגנים במערכת העיכול.

4.3. חלק ג'

כאמור, בחלק זה של הניסוי: שתי הקבוצות קיבלו את התוסף הפרוביוטי על פי הוראות היצרן, אך קבוצת הטיפול קיבלה במנה ההזנה שחת ללא הגבלה, לעומת קבוצת הביקורת שהוגבלה במנה של 60 ג'/גדי/יום.

מטרת ניסוי זה הייתה לבדוק באם תוספת השחת לקבוצת הטיפול, תעזור בשימור מאזן החומציות בכרס, וכך יימנעו תופעות כגון ירידה כרונית ב- pH הכרס, תאבון ירוד ועליה לא מספקת של משקל גוף.

על פי ניסוי של Biricik & Türkmen משנת 2001 , נצפו השפעות של עלייה בנעכלות ח"י, חומר אורגני ו- NDF בכרס כאשר הוסיפו שמרים מסוג S. cervisiae למנה שהכילה 70% מזון גס, לעומת מנה שהכילה 70% מזון מרוכז. ביקשנו לבדוק באם לתוספת הפרוביוטיקה למנה המכילה רמת שחת גבוהה יותר (מזו המקובלת בממשק הזנה סטנדרטי) תהיינה השפעות דומות אשר תבואנה לידי ביטוי במדדי גדילה ובריאות לפני ואחרי גמילה.

מבדיקת התוצאות שהתקבלו, נראה כי התוסף הפרוביוטי, בשילוב עם מנת הטיפול לא תרם באופן מיוחד לבריאות הגדיים וגדילתם: ערכי אלבומין נמוכים יותר באופן מובהק התקבלו בקבוצת הטיפול שהורשתה לצרוך מזון גס באופן חופשי. ערכים אילו יכולים להעיד על מצב בריאותי לא תקין, כגון מחלת כבד או כליות ומצב פיזיולוגי נחות. גם בבחינת ערכי אמוניה בכרס התגלו הבדלים מובהקים בין הקבוצות, כאשר בקבוצת הטיפול היו הערכים גבוהים יותר. ממצא זה מעיד על רמה גבוהה יותר של חנקן המצטבר בכרס בצורת אמוניה וחוסר תיאום בין שחרור האנרגיה הזמינה לחנקן הזמין (בונדי, 1982). מאחר ובדיקות השתנן בפלסמה לא נבדלו בין הקבוצות, ניתן להסיק כי כמות זו נצרכה על ידי הבקטריות בכרס ואיכות החלבון הנספג הייתה זהה בין הקבוצות, מאידך, כמות החלבון הנספג בקבוצת הטיפול הייתה נמוכה יחסית לקבוצת הביקורת וכנראה הביאה לירידת ריכוז האלבומין בפלזמה (Wattiaux, 1999).

ככל הנראה השיפור לכאורה בחלבון המיקרוביאלי הזורם למעי לא הביא לשיפורים המיוחלים בבריאות וגדילת הגדיים, שכן, כמו בחלק ב׳ של הניסוי, גם כאן נצפו כאבי בטן לגדיים וגדיות הניסוי. אילו הודגשו על ידי עמידה עם גב קעור, הפרשות רכות ובטן נפוחה.

אופן עריכת הניסוי מבחינת ממשק ההזנה גרם לכך שהיחס בין המזון הגס למרוכז במנה השתנה כל העת במהלך הניסוי (גרף מס׳ 25), וייתכן כי לא נצפו הבדלים משמעותיים יותר בין הקבוצות, כיוון שההבדלים בין הרכבי המנות מבחינת היחס בין המזון הגס למרוכז במנה, לא היו גדולים מספיק כפי שהיו בניסוי של Biricik & Türkmen משנת 2001. סיבה נוספת אפשרית לצריכה המופחתת של מזון מרוכז, כפי שבאה לידי ביטוי בקבוצת הטיפול, טמונה בנפח שתופסת השחת בכרס הגדיים המתפתחת: כשהכרס מתמלאת מתרחש היזון חוזר ובעל החיים מפסיק לאכול, דבר זה משפיע בהכרח על צריכת המזון ועליה במשקל. אמנם, במצב זה עולה הנעכלות, שכן המזון שוהה בכרס זמן רב יותר, אולם המזון הגס מכיל פחות אנרגיה, הדרושה לגדילת הגדיים. (Wattiaux, 1999)

5. מסקנות

במתן התוסף הפרוביוטי לכבשים, לא נצפו תופעות חיוביות כגון עליה באחוז היחסי של חומצה פרופיונית על חשבון חומצה אצטית. בנוסף, Total VFA עלה, ככל הנראה עקב ייעול מסלולי הייצור שלהם, מה שהביא בסופו של דבר לעליה בחומציות הכרס, דבר שאינו רצוי באופן כללי.

עיקר השפעת הטיפול הפרוביוטי על מעלי-גירה צעירים התבטא בדיכוי מערכת החיסון, מה שהביא לסטאטוס פיזיולוגי נחות ולא קידם מדדי גדילה ביחס לקבוצת הביקורת. גם כשהתאפשרה לגדיים גישה בלתי מוגבלת למזון גס לא נצפה שיפור. דבר זה נגרם, ככל הנראה, עקב חוסר תיאום בין שחרור האנרגיה והחנקן הדרוש לקיום המיקרואורגניזמים בכרס, בנוסף לתופעות דיכוי מערכת החיסון.

עם זאת חשוב לזכור כי למרות שמאפיינים רבים הנם דומים בין החיידקים הפרוביוטיים, ישנם גם הבדלים רבים ולכן כל קו צריך להבחן באופן ספציפי (Saxelin et al. 2005). אכן, מצאתי כי ככל שהרביתי בקריאת מחקרים, כן גיליתי כי יש שונות רבה בין השפעות הקווים הפרוביוטים השונים והשפעותיהם על בעלי חיים שונים. עם זאת, מוסכם כי דרך פעולתם נעשית בארבעה מישורים עיקריים והם: השפעה על מערכת החיסון, חיזוק המחסום המוקוזי, תחרות עם פתוגנים ודיכוי דלקות (Saxelin et al. 2005).

חזק חזק ונתחזק

6. מקורות:

Abu-Tarboush, H.M., Al-Saiady, M.Y., El-Din, A.H.K. 1996. Evaluation of diet containing Lactobacilli on performance, fecal coliform and Lactobacilli of young calves. Animal Feed Science Technology 57:39-49.

Agarwal, N., Kamra, D.N., Chaundhary, L.C., Agarwal, I., Sahoo, A., Pathak, N.N. 2002.Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. Letters in app. Microb. 34:329-336.

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J., von der Weid, T. 2003. Supplementation of food with Enterococcus faecium (SF68) stimulates immune function in young dogs. J. Nutr. 133:1158-1162.

Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., Morgavi, D.P., Ghorbani, G.R., Kauts, W., Leedle, J.A.Z. 2003. Effect of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. J. Anim. Sci. 81:1628-1640.

Biricik, H., Türkmen, İ.İ. 2001. The effect of Saccharomyces cerervisiae on in vitro rumen digestibilities of dry matter, organic matter and Neutral detergent fiber of different forage:concentaration ratios in diets. J Fac Vet Med. 20:29-33.

Brandt, K., Alatossava, T. 2003. Specific identification of certain probiotic Lactobacillus rhamnosus starins with PCR primers based on phage-related sequences. International J. Food Microbiol. 84:189-196.

Chamberlain, A.T., Wilkinson, J.M.: Protein, In: Chamberlain, A.T.: Feeding the dairy cow, Chalcombe publications, Lincoln, pp 63-75, 2002.

Chang, Y.H., Kim, J.K., Kim, H.J., Kim, W.Y., Kim, Y.B., Park, Y.H. 2001. Selection of potential probiotic Lactobacillus starin and subsequent in vivo studies. Antonie van Leeuwenhoek 80:193-199.

Collins, M.D., Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr. 69(suppl):1052S-1057S.

Coulomb, J.J. & Favreau, L. 1963. A new simple semi-micro method for colorimetric determination of urea. Clinical Chemistry. 9:102-108.

Cruweagen, C.W., Jordaan, I., Venter, L. 1996.Effect of Lactobabillus acidophilus supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. J Dairy Sci. 79:483-486.

Dehority, B.A. 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: anatomy, physiology and microbial digestion of plants. J. Appl. Anim. Res. 21:145-160.

Draksler, D., Gonzales, S., Oliver, G. 2004. Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. Reprod. Nutr. Dev. 44:397-405.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feency, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., Shanahan, F., Collins, J.K. 1999. Probiotics: from myh to reality. Demonstrations of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie van Leeuwenhoek 76:279-292.

Ewaschuk, J.B., Naylor, J.M., Chirion-Trejo, M., Zello, G.A. 2004. Lactobacillus rhamnosus strain GG is a potential probiotic for calves. Can. J. Vet. Res. 68(4):249-253.

Fumiaki, A., Ishibashi, N., Shimamura, S. 1995. Effect of administration of Bifidobacteria and Lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. J Dairy Sci. 78:2838-2846.

Ghorbani, G.R., Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Leedle, J.A.Z. 2002. Effect of bacterial direct-fed microbials ruminal fermentation, blood variables, and microbial populations of feedlot cattle. J. Anim. Sci. 80:1977-1986.

Giger-Reverdin, S., Bezault, N., Sauvant, D., Bertin, G. 1996. Effects of probiotic yeasts in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. Animal Feed Science Technology. 63:149-162.

Han Goh, S., Facklam, R.R., Chang, M., Hill, J.E., Tyrrell, G.J., Burns, E.C.M., Chan, D., He, C., Rahim, T., Shaw, C., Hemmingsen, S.M. 2000. Identification of Enterococcus species and phenotypically similar Lactococcus and Vagococcus species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequence. J. Clin. Microbial. 38(11):3953-3959.

Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., de-Vos, W.M. 2002. Molecular diversity of Lactobacillus spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined be specific amplification of 16s ribosomal DNA. Appl. Environ. Microbiol. 68(1):114-123.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, K., Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73 (suppl):365S-373S.

Holzapfel, W.H., Hebrer, P., Snel, J., Schillinger, U. in't Veld, J.H.J.H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International J. Food Microbiol. 41:85-101.

Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C. 2004. Probiotics. Best practice & Research Clinical Gastroenterology. 18(2):299-313.

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää. P., Arvilommi, H., Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. Am. J. Clin. Nutr. 73(suppl):444S-450S.

Jin , L.Z., Marquardt, R.R., Zhao, X. 2000. A strain of Enterococcus faecium inhibits adhesion of entertoxigenic Escherichia coli to porcine small intestine mucus. Appl. Environ. Microbiol. 66(10):4200-4204.

Kalinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., Palve, A. 2003. Comparison of real-time PCR with SYBR green 1 or 5'-nuclease and dot blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. Microbiology 149:269-277.

Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. Current Science 89(1):124-134.

Kim, S.W., Standorf, D.G., Romano-Rosario, H., Tokoyama, M.T., Rust, S.R. 2000. Potential use of Propionibacterium acidipropionici, strain DH42, as a direct-fed microbial for cattke. J. Anim. Sci. 78(Suppl. 1):292.

Krehbiel, C.R., Rust. S.R., Zhang, G., Gilliland, S.E. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. J. Anim. Sci. 81(suppl.2):E120-E132.

Krom, M.D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reduction using salicylate and dichloroisocyanurate. The Analyst, 105:305-316.

Kung, L. Jr., Hession, A.O. 1995. Preventing in vitro accumulation in ruminal fermentation by inoculation with Megasphaera elsdenii. J. Anim. Sci. 73:250-256.

Marciňáková, M., Simonová, M., Lauková, A. 2004. Probiotic properties of Entercoccus faecium EF9296 strain isolated from silage. Acta. Vet. Brno. 73:513-519.

Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R. : Genus- and specific PCR primers for the detection and identification of Bifidobacteria. In: Tannock, G.W.: Probiotics and Prebiotics: Where are We Going?, Caister Academic Press, Dunedin, pp 79-96, 2002

Miller-Webster, T., Hoover, W.H., Holt, M. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. J. Dairy. Sci. 85:2009-2014.

Morotomi, M., Yuki, N., Kado, Y., Kushiro, A., Shimazaki, T., Watanabe, K., Yuyama, T. 2002. Lactobacillus equ sp. Nov., a predominant intestinal Lactobacillus species of the horse isolated from feaces of healthy horses. International J. of Systemic and Evolutionary Microbiology. 52: 211-214.

Morrill, J.L., Morrill, J.M., Feyerherm, A.M. 1995. Plasma proteins and a probiotic as ingredients in milk replacer. J Dairy Sci. 78:902-907.

Nocek, J.E., Kautz, W.P., Leedle, A.Z., Allman, J.G. 2002. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation ans in-situ digestion in dairy cattle. J. Dairy. Sci. 85:429-433.

Perdigón, G., Vintini, E., Alvarez, S., Meedina, M., Medici, M. 1998. Study of the possible mechanisms involved un the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 82:1108-1114.

Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de-Vos, W.M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. Curr. Opin. Biotechnol. 16(2):204-211.

Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Taras, D., Schwek, P., Schierack, P., Schmidt, M.F.G., Weiler, L.H., Tedin, K. 2005. Influence of a probiotic Enterococcus faecium starin an development of the immune system os sows and piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 105:151-161.

Roy, D., Ward, P., Vincent, D., Mondou, F. 2000. Molecular identification of potentially probiotic Lactobacilli. Current Microbiology 40:40-46.

Simmering, R., Blaut, M. 2001. Pro- and Prebiotics – The tasty guardian angels?. Appl. Microbiol. Biotech. 55(1):19-28.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y. 2001.Diet dependent shifts in the bacterial population of the rumen reaveales with real time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67(6):2766-2774.

Tannock, G.W.: Probiotics and Prebiotics: Where are We Going?. In: Tannock, G.W.: Probiotics and Prebiotics: Where are We Going?, Caister Academic Press, Dunedin, pp 1-30, 2002

Varel, V.H., Kreikemeier, K.K. 1994. Response to various amounts of Aspergillus oryzae fermentation extract on ruminal metabolism in cattle. J. Dairy. Sci. 77:3081-3086.

Vaughan, E.E., de Vries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A., de Vos, W.M. 2002. The intestinal LABs. . Antonie van Leeuwenhoek 82:341-352.

Ware, D.R., Read, P.L., Manfredi, E.T., 1988a. Lactation performance of two large dairy herds fed Lactobacillus acidophilus strain BT138 in a switchback experiment. J. Dairy. Sci. 71(Suppl.1):219.

Wattiax, M.A.: Nutrition and feeding, Protein and metabolism in dairy cows. In: Wattiax, M.A.: Dairy essentials – four topics. The Babcock Institute, Madison, pp 1-28, 1999.

Weimer, P.J. 1998. Manipulating ruminal fermentation:A microbial ecological perspective. J. Anim. Sci. 76:3114-3122.

Weinberg, Z.G., Muck, R.E., Weimer, P.J. 2003. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. J. Appl. Microbiol. 94:1066-1071.

Weinberg, Z.G., Chen, Y., Gamburg, M. 2004. The passage of Lactic acid bacteria from sulage into rumen fluid, in vitro studies. J. Dairy Sci. 87:3386-3397.

Werner, G., Strommenger, B., Klare, I., Witte, W. 2004. Molecular detectin of linzolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis by use of 5' nuclease real time PCR compared to a modified classical approach. J. Clin. Microbiol. 42(11):5327-5331.

Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Innes, G.M., Newbold, C.J. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture in the diet of dairy cows on milk yeield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. J. Anim. Sci. 69:3016-3026.

Woodford, N., Tysall, L., Auckland, C., Stockadle, M.W., Lawson, A.J., Walker, R.A., Livermore, D.M. 2002. Detection of oxazolidinone-resistant Enterococcus faecalis and Entercoccus faecium strains by real-time PCR and PCR restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 40(11):4298-4300.

Yoom, I.K., Stern, M.D. 1995. Influence of direct-fed microbials on ruminal fermentation and performance of ruminants: A review. Asian-Australian J. Anim. Sci. 8:533-555.

בונדי, א.:תהליכי העיכול ואיתורם, ספיגת מוצרי עיכול,ב: ניב, ד.: הזנת בעלי חיים, הוצ' ספרים ע"ש י"ל מאגנס, האוניברסיטה העברית, ירושלים תשמ"ב (1982) עמ' 42-39.

מבג'יש, ס., קופר, ט., סבסטיאן, ק., שמאי, א., בר שירה, ע., פרידמן, א. 2005. השפעת מתן תוסף פרוביוטי לגדיים מיד לאחר המלטה ועד גיל שלושה חודשים, על קצב גדילה ומטבוליטים בדם ובכרס. כנס השנתי ה-17 למדעי הבקר.

7. Abstract

The term "probiotic" has been defined as "a live microbial feed supplement, which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance" and has been used to describe viable microbial cultures, culture extracts, enzyme preparations, or various combinations of the above. Therefore the U.S.FDA has required feed manufacturers to use the term "direct-fed microbials" (DFM) instead of probiotic and has narrowed the definition to "a source of live, naturally occurring microorganisms".

The original concept of feeding bacteria DFM to livestock was based primarily on potential beneficial postruminal effects, including improved establishment of gut microflora. There has been indication that certain bacteria DFM may also have beneficial effects in the rumen.

The probiotic strains classified as 'LAB' (lactic acid bacteria) are gram positive, nonsporing, catalase negative organisms that are devoid of nonaerobic habitat but are earotolerant, acid tolerant and strictly fermentative: lactic acid is the major end product of sugar fermentation.

The first objective of this study was to measure the capability of *Lactobacillus acidophilus* and *Enterococcus Faecuim* from the probiotic feed additive called Fastrack®, Probiotic Pack (product of ©2000 Conklin Inc. 459299E 1100) to survive in gastrointestinal tract (GI) of ruminants. Two ruminally canulated sheep, receiving a diet containing 50% hay, were used for a period of 12 weeks: 6 periods of two weeks each. In each period sheep were received 0-50 g/d of the probiotic supplement. On the last day of each period blood, feces and rumen fluid samples were taken (experiment A).

Second objective of this study was to evaluate the effects of providing bacterial DFM to kid goats from birth to age of three months. A group of 20 kid goats randomly divided into two groups, 1 of each (treatment group) was supplemented with the probiotic additives (Fastrack® Probiotic Pack, liquid dispersible, kick-of) beginning with day 1 till day 90; while the other group of 10 kid goats remained untreated (control group).

A second growth experiment was carried out in order to measure the effect of providing bacterial DFM to kid goats, under different nutritional rations (experiment C). A group of 13 kid goats randomly divided into two groups, both groups was supplemented with the probiotic additives (Fastrack® Probiotic Pack, liquid dispersible, kick-of) beginning with day 1 till day 90. One group had ad-lib access to hay (treatment group); while the other group was restricted to 60 g/d hay for a kid (control group).

Results of RT Real Time PCR showed that the enrichment of the examined microorganisms in the rumen wasn't a dose response but a fluctuate one. Detection of the microorganisms in the feces showed that enrichment of *Enterococcus Faecuim* is low and stable while *Lactobacillus acidophilus* was undetected at all. This indicated that *Lactobacillus acidophilus* was not survived during the passage through the lower GI tract. As for VFA concentrations: propionic and valleric acids declined while acetic and butyric acids were increased, after feeding probiotic at 30 g/d for two weeks. Total VFA increased from the beginning of administrating DFM, probably as a result of forming more effective production VFA. This could also be the reason for the decrease in ruminal pH.

Experiment B – In this experiment (probiotic vs. control) female kid goats that received the probiotic supplementation had shown better food digestibility: they consumed less concentrate food but reached the same final weight as the female kid goats in the control group. The treatment group suffered from colic and diarrhea.

Experiment C – In this experiment (ad lib hay vs. control), the treatment group had lower serum albumin, higher ruminal ammonia, diarrhea and colic. This might indicate of an inferior physiologic condition caused by accumulation of $N\text{-}NH_3$ in the rumen and lack of correlation between energy and nitrogen release.

Implications:

By administrating probiotic feed additive to the sheep, no positive affects as increasing percentage of propionic acid in the rumen, was observed. Furthermore total VFA increased and led to higher acidity in the rumen. Primary effects of the probiotic treatment for kid goats was down regulating of the immune system, this led to an

inferior physiologic condition and did not enhance growth parameters vs. control group.

When the kid goats had ad lib access to hay, no improvement was observed, probably because of asynchrony between the release of energy and nitrogen in the rumen in addition to down regulation of the immune system.