

УДК 66.663.1

Вічко О.І.¹, асистент (o.vichko.te@gmail.com) ©**Кухтин М.Д.¹**, д.вет.н. (Kuchtyun@yandex.ru)**Новіков В.П.²**, д.б.н., професор (vnovikov@polynet.lviv.ua)¹Тернопільський національний технічний університет імені І.Пулюя
(м. Тернопіль, Україна)²Національний університет «Львівська політехніка» (м. Львів, Україна)**МІКРОБІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІОТИЧНОЇ
КИСЛОМОЛОЧНОЇ ДОБАВКИ З АСОЦІАЦІЇ КУЛЬТУРИ
«ТИБЕТСЬКИЙ ГРИБОК» ТА ВПЛИВ ЇЇ НА КИШКОВИЙ
МІКРОБІОЦЕНОЗ ПОРОСЯТ**

Наведено результати мікробіологічних досліджень впливу кисломолочної добавки зі природної асоціації мікроорганізмів «тибетський грибок» на ріст умовно-патогенної мікрофлори в лабораторних умовах та на кишковий мікробіоценоз поросят. Виявлено, що всі тест-культури умовно-патогенних мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesentericus*, *Mycobacterium luteum*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger*) були чутливими (зона затримки росу тест-культури від 21 до 25 мм) і високо-чутливими (зона затримки росту більше 25 мм) до пробіотичних бактерій кисломолочної харчової добавки. Дослідження впливу різної концентрації NaCl та жовчі на кислотоутворюючу активність культури «тибетський грибок» виявило, що активне кислотоутворення відбувалося за концентрації 4 % NaCl у середовищі (прокип'ячене молоко) культивування і за 20 % жовчі. За концентрації NaCl у середовищі 6 % кислотоутворення не відбувалося. Це вказує на те, що мікробна асоціація здатна витримати несприятливі умови шлунково-кишкового тракту і розвиватися в ньому. При згодовуванні кисломолочної добавки поросят протягом 30 днів встановлено, що в кишечнику дослідних поросят у жодному випадку не було виявлено патогенних бактерій та патогенних грибів. Основна мікрофлора представлена лакто- та біфідобактеріями ($10^8 - 10^9$), їх кількісний вміст на 2 порядки більший, ніж у поросят контрольної групи, що позитивно впливало на процеси травлення.

Ключові слова: кисломолочна добавка, тибетський грибок, пробіотичні мікроорганізми, умовно-патогенна мікрофлора, натрію хлорид, жовч, мікробіоценоз кишечника.

УДК 66.663.1

¹Вічко Е.И., ¹Кухтин Н.Д., ²Новиков В.П.¹Тернопольский национальный технический университет им. И.Пулюя²Национальный университет «Львовская политехника»**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КИСЛОМОЛОЧНОЙ ДОБАВКИ ИЗ
АССОЦИАЦИИ КУЛЬТУРЫ «ТИБЕТСКИЙ ГРИБОК» И ВЛИЯНИЕ ЕЁ
НА КИШЕЧНЫЙ МИКРОБИОЦЕНОЗ ПОРОСЯТ**

Приведены результаты микробиологических исследований влияния кисломолочной добавки из естественной ассоциации микроорганизмов «тибетский грибок» на рост условно-патогенной микрофлоры в лабораторных

условиях и на кишечный микробиоценоз поросят. Обнаружено, что все тест-культуры условно-патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesentericus*, *Mycobacterium luteum*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger*) были чувствительными (зона задержки роста тест-культуры от 21 до 25 мм) и высокочувствительными (зона задержки роста больше 25 мм) к пробиотическим бактериям кисломолочной пищевой добавки. Исследование воздействия разной концентрации NaCl и желчи на кислотообразующую активность культуре «тибетский грибок» происходило при концентрации 4% NaCl в среде (прокипячённое молоко) культивирования и при 20% желчи. При концентрации NaCl в бреду 6% кислотообразование не происходило. Это указывает на то, что микробная ассоциация способная выдерживать неблагоприятные условия желудочно-кишечного тракта и развиваться. При скармливании кисломолочной добавки поросятам в течении 30 дней определено, что в кишечнике подопытных поросят ни в одном случае не было обнаружено патогенных бактерий и патогенных грибов. Основная микрофлора представлена лакто- та бифидобактериями (10^8 - 10^9), их количественный состав на 2 порядка больше, чем у поросят контрольной группы, что позитивно влияло на процессы пищеварения.

Ключевые слова: кисломолочная добавка, тибетский грибок, пробиотические микроорганизмы, условно-патогенная микрофлора, натрия хлорид, желчь, микробиоценоз кишечника.

UDC 66.663.1

¹O Vichko, ¹M Kuchtyн, ²V Novikov

¹Ternopil Ivan Pul'uj National Technical University, Ruska str. 56, Ternopil, Ukraine, 46001

²Lviv Polytechnic National University, 12 Bandera street, Lviv, Ukraine, 79013

MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF PROBIOTIC SOUR MILK FEED SUPPLEMENT FROM CULTURE ASSOCIATION LACTOMYCES TIBETICUS AND ITS INFLUENCE ON INTESTINAL MICRO-BIOCENOSIS OF PIGLETS

*The research provides the microbiological investigation findings of sour milk feed supplement from natural association of microorganisms "Lactomyces tibeticus" influence on the growth of opportunistic microflora in laboratory conditions and on the intestinal tract of piglets. It has been found that all test-cultures of opportunistic microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mesentericus*, *Mycobacterium luteum*, *Proteus vulgaris*, *Aspergillus niger*) were susceptible (growth retardation zone of test-culture from 21 to 25 mm) and highly susceptible (growth retardation zone over 25 mm) to probiotic bacteria of lactic acid feed supplement. Investigation for the influence of varied NaCl concentrations and bilis on acid-forming activity of culture "Lactomyces tibeticus" demonstrated that active acid-forming occurred at 4% NaCl concentration in cultivation media (boiled milk) and at 20% of bilis. At NaCl concentrations in 6% medium no acid-forming occurred. This proves that microbial association can withstand unfavourable conditions of gastrointestinal tract and develop in it. It has been found that no pathogenic bacteria and pathogenic fungi were detected in the intestine of test piglets during the feed of sour milk supplement within 30 days. The main microflora is represented by lacto-*

and bifido-bacteria (10^8 - 10^9), their quantity content is twofold higher than in control group piglets thus having a positive effect on digestion processes.

Key words: sour milk supplement, *Lactomyces tibeticus*, probiotic microorganisms, opportunistic-pathogenic microflora, NaCl, bilis, intestinal microbiocenosis.

Вступ. Сьогодні, незважаючи на те, що промисловість випускає значну кількість пробіотичних препаратів проблема корекції і нормалізації мікрофлори кишечника все ще є актуальною. Це пов'язано з тим, що далеко не всі пробіотичні препарати після довготривалого застосування проявляють стійку активність. Тому нині жорсткішими стали вимоги до таких препаратів щодо забезпечення їх ефективності і безпечності. Так, значний інтерес викликають кисломолочні добавки на основі мікробної асоціації «тибетський грибок», завдяки вмісту в ньому широкого спектру біологічно активних речовин, відносній простоті культивування та можливості підтримання культури тривалий час в активному стані [1, 2, 3].

Нами створено кисломолочну харчову добавку на основі природної асоціації мікроорганізмів «тибетський грибок» (*Lactomyces tibeticus*). Кисломолочна харчова добавка – це напій, який отриманий за допомогою ферментації молока мікробною асоціацією «тибетський грибок». За мікробіологічними показниками готова добавка містить життєздатних молочнокислих бактерій від 10^8 - 10^9 КУО/см³, дріжджів 10^4 КУО/см³.

Мета роботи. Визначити мікробіологічні показники кисломолочної харчової добавки та вплив її на кишковий мікробіоценоз поросят.

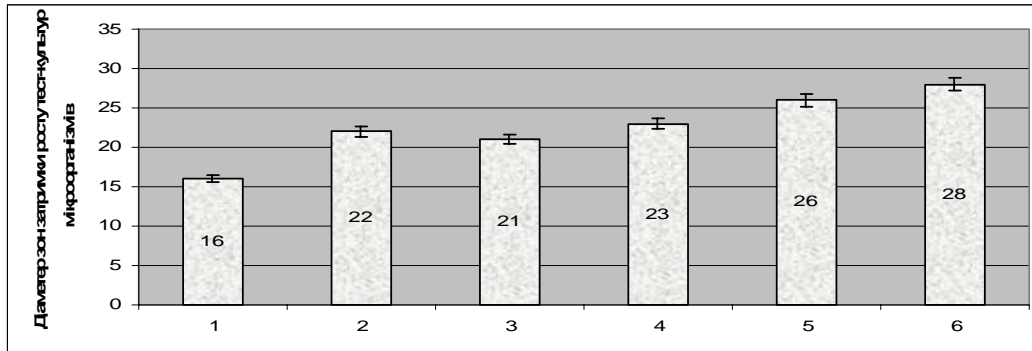
Матеріали і методи. Кисломолочний добавку одержували шляхом внесення 2,5-5% посівного матеріалу з асоціації мікроорганізмів тибетський грибок в стерильне коров'яче молоко з масовою часткою жиру 2,5% та культивування до значення кислотності середовища 85 – 120⁰Т. Кислотність одержаної харчової добавки визначали за стандартною методикою. Вплив натрію хлориду та жовчі на кислотоутворюючу активність асоціації культури «тибетський грибок» визначали, додаючи у прокип'ячене молоко медичну жовч у концентраціях 10 %, 20 %, 30 % та NaCl у концентраціях – 2 %, 4 %, 6,5 %. Родовий і видовий склад мікрофлори кишечника поросят визначали за загальноприйнятими методиками. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів проводили згідно визначника Берджі, 1997р.

Результати досліджень. У лабораторних умовах вивчали дію мікроорганізмів з асоціації «тибетський грибок» на тест культури умовно-патогенних мікроорганізмів. Результати досліджень наведено на рис 1.

Як видно з рис 1, що практично всі тест-культури умовно-патогенних мікробів були чутливими і високо-чутливими до пробіотичних мікроорганізмів з асоціації «тибетський грибок». Це вказує на їх добрі антагоністичні властивості відносно умовно- і патогенних мікроорганізмів.

чних продуктів під час проходження через шлунково-кишковий тракт живими залишаються 20-30%. Втрати мікроорганізмів пов'язані з несприятливим середовищем у шлунку та кишечнику (кисле середовище шлункового соку та наявність жовчі в тонкому відділі кишечника), такі втрати

зменшують функціональний вплив кисломолочних пробіотичних продуктів на організм тварини чи людини. Тому ми досліджували вплив різної концентрації *NaCl* та жовчі на кислотоутворюючу активність культури «тибетський грибок». Результати дослідження наведено на рис. 2 та 3.



1 - *Escherichia coli*, 2 - *Staphylococcus aureus*, 3 - *Bacillus mesentericus*, 4 - *Mycobacterium luteum*, 5 - *Proteus vulgaris*, 6 - *Aspergillus niger*.

Примітка. Діаметр зон затримки росту тест-культур до 15 мм – мікроорганізм нечутливий, 16-20 мм – помірно-чутливий, 21-25 мм – чутливий, 26 мм і більше – високочутливий.

Рис. 1. Чутливість умовно-патогенних тест-культур до мікроорганізмів з асоціації «тибетський грибок», $M \pm m$, $n=18$

Як відомо, що із молочнокислих бактерій, які входять в склад кисломоло

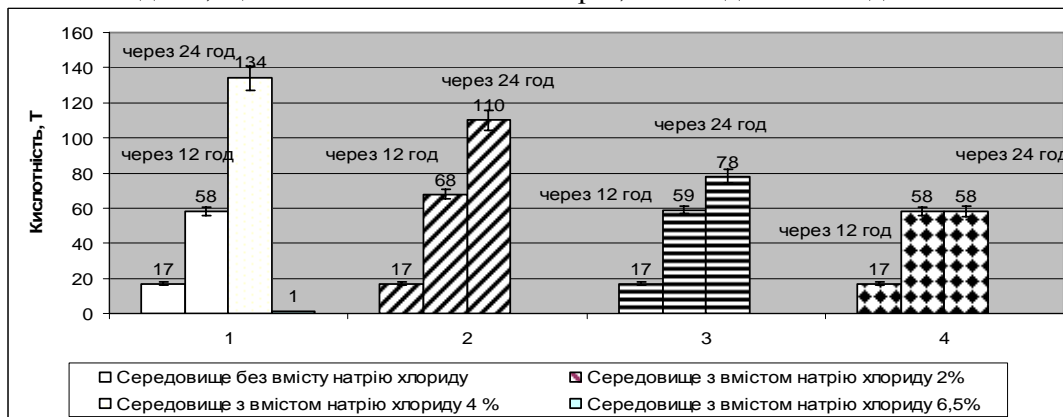


Рис. 2. Вплив *NaCl* на кислотоутворюючу активність культури „тибетський грибок”, $M \pm m$, $n=12$

Як видно з рис. 2 та 3, що ще активне кислотоутворення відбувалося за концентрації *NaCl* в середовищі культивування 4 % і жовчі 20%. Це вказує на те, що мікробна асоціація здатна витримати несприятливі умови шлунково-кишкового тракту і розвиватися в ньому. Хоча дані літератури щодо стійкості мікробних культур до жовчі вказують, що стійкість відмічається переважно у бактерій, які виділені з ШКТ ссавців, а у мікроорганізмів виділених з інших джерел може менш проявлятися [4].



1 – культивування у молоці прокип'яченому без жовчі; 2 – культивування у молоці прокип'яченому з 10 % жовчі; 3 – культивування з 20% жовчі; 4 – культивування з 30 % жовчі.

Рис. 3. Вплив жовчі на кислотоутворюючу активність культури „тибетський грибок”, М±m, n=12

З метою визначення впливу кисломолочної харчової добавки на кишковий мікробіоценоз поросят, ми згодовували її поросяткам 60 денного віку протягом 30 днів. Результати досліджень наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Склад мікрофлори кишечника у поросят до та після застосування кисломолочної харчової добавки, КУО, М±m, n=20

Мікрофлора	Групи поросят, які приймали	
	стандартний раціон (контроль)	кисломолочну харчову добавку (дослід)
Загальна кількість бактерій (товстий відділ)	$(10 \pm 1,1) \times 10^8$	$(10 \pm 0,5) \times 10^{10}$
Патогенні мікроорганізми (<i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i>)	Не виявлено	Не виявлено
Загальна кількість <i>E. coli</i>	$(0,2 \pm 0,06) \times 10^8$	$(1,7 \pm 0,05) \times 10^8$
Лактозонегативні ентеробактерії	$(0,8 \pm 0,12) \times 10^6$	$(0,5 \pm 0,02) \times 10^6$
Гемолітична кишкова паличка	Виявлено у трьох поросят	Не виявлено
Стафілококи сапрофітні	1×10^4	1×10^4
Стафілококи гемолітичні	Не виявлено	Не виявлено
Стрептококи не гемолітичні	10^5	10^4
Біфідобактерії	$(5,6 \pm 0,5) \times 10^7$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^9$
Лактобактерії	$(4,2 \pm 0,6) \times 10^6$	$(6,3 \pm 0,4) \times 10^8$
Дріжджі	$(0,3 \pm 0,01) \times 10^4$	$(0,7 \pm 0,01) \times 10^4$

Мікробіологічні дослідження біоматеріалу на визначення кількісного і якісного складу мікрофлори встановили, що в кишечнику дослідних поросят у жодному випадку не було виявлено патогенних бактерій та патогенних грибів. Основна мікрофлора представлена лакто- та біфідобактеріями, їх кількісний вміст на 2 порядки більший, ніж у поросят контрольної групи. Це вказує на позитивний вплив кисломолочної добавки на кишковий мікробіоценоз поросят, підвищення антагоністичної активності його автохтонної мікрофлори, а також її кількісного зростання проти показників у контрольній групі поросят. У контрольних тварин в кількох (трьох) поросят було виділено та ідентифіковано

гемолітичну кишкову паличку, яка створює небезпеку щодо нормального травлення у поросят, порушуючи мікробіоценоз кишечника.

Таким чином, розроблена за допомогою ферментації молока мікробною асоціацією «тибетський грибок» кисломолочна харчова добавка, проявляє пробіотичну активність до ряду тестових бактерій та грибів, здатна витримувати значні концентрації жовчі та іонів хлориду натрію, позитивно впливати на кишковий мікробіоценоз у поросят.

Висновки

1. Кисломолочна харчова добавка на основі природної асоціації мікроорганізмів «тибетський грибок» проявляла антимікробну активність до тест-культур умовно- і патогенних мікроорганізмів.

2. Пробіотичні мікроорганізми, які входять у склад кисломолочної харчової добавки витримують дію несприятливих чинників шлунково-кишкового тракту і добре приживаються в кишечнику поросят.

3. Застосування кисломолочної харчової добавки поросят протягом 30 днів сприяло формуванню стабільного мікробіоценозу кишечника, основною мікрофлорою якого були лакто- і біфідобактерії ($10^8 - 10^9$).

Перспективи подальших досліджень. Полягають у розробленні технологічної схеми виробництва кисломолочного продукту.

Література

1. Елинов Н.П. Микробиота природной ассоциации “Тибетский рис”/ Н.П. Елинов, О.Г.Ларина // Проблемы медицинской микологии. – 1999. – Том.1. – №1 – С. 51–56.

2. Дослідження мікробіоти „тибетський грибок” для розробки функціонального композиційного мікробного препарату / О.І. Вічко, Н.С. Щеглова, В.Г. Черевцова та ін. // Науковий вісник Ужгородського університету. – 2008. – № 24. – С.114–116.

3. Elinoar Shavit. Renewed interest in kefir, the ancient elixir of longevity. //Fungi. – 2008. – Vol.1:2. – P.14–18.

4. Chou L.S. Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* / L.S. Chou, B. Weimer // J. Dairy Sci. – 1999. – №1. – P. 23 – 31.

Рецензент – д.с.-г.н., професор Цісарик О.Й.