

PAULINA MARKOWIAK-KOPEĆ, KATARZYNA ŚLIŻEWSKA

PRZEŻYWALNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW PROBIOTYCZNYCH W MODELU *IN VITRO* UKŁADU POKARMOWEGO DROBIU

Streszczenie

Celem pracy była ocena przeżywalności probiotycznych szczepów bakterii *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* podawanych bez dodatku paszy lub z jej udziałem w warunkach modelowych, symulujących wybrane odcinki przewodu pokarmowego drobiu. Mikroorganizmy te wchodziły w skład nowo opracowanych mieszanek probiotycznych (A, B i C). Przeżywalność badanych bakterii i drożdży w symulowanych warunkach wola, żołądka i jelita cienkiego oznaczano metodą hodowlaną. Początkowo średnia liczba bakterii *Lactobacillus* spp. wynosiła $(1,00 \div 1,95) \times 10^9$ jtk/ml, natomiast drożdży – $(1,04 \div 3,00) \times 10^7$ jtk/ml. W wyniku pasażu próbek bez dodatku paszy liczba bakterii oraz drożdży ulegała obniżeniu w kolejnych odcinkach symulowanego przewodu pokarmowego i w jelicie cienkim była niższa średnio o 2 rzędy wielkości. W obecności paszy natomiast liczba bakterii *Lactobacillus* spp. w jelicie cienkim była wyższa średnio o 1 rząd wielkości, a drożdży – średnio o 1,5 rzędu wielkości w porównaniu z mieszankami bez dodatku paszy. Dodatek paszy stanowił zatem czynnik ochronny przed niekorzystnymi warunkami środowiska układu pokarmowego w badaniach modelowych. Na podstawie uzyskanych wyników można wskazać na potencjalne zastosowanie mieszanek probiotycznych jako dodatku do pasz dla drobiu.

Słowa kluczowe: probiotyki, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, układ pokarmowy, drób

Wprowadzenie

Trawienie pokarmu u drobiu odbywa się w układzie pokarmowym, który składa się z przełyku, wola, żołądka gruczołowego, żołądka mięśniowego, jelita cienkiego (dwunastnica, jelito czcze i biodrowe), jelita grubego (ślepe i proste) oraz kloaki [3]. Ptaki nie mają uzębienia, dlatego pokarm połknięty jest w całości. Zostaje on zwilżony śliną w dziobie i przesuwany do przełyku, gdzie jest rozmiękczone i rozpuszczane przez enzymy i śluz [4, 20]. W żołądku gruczołowym następuje przygotowanie pokarmu do procesu trawienia. Na tym etapie wydzielany jest kwas solny. Następuje tu tak-

Mgr inż. P. Markowiak-Kopeć, dr hab. inż. K. Śliżewska, prof. nadzw., Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź. Kontakt: paulina.markowiak@edu.p.lodz.pl; katarzyna.slizewska@p.lodz.pl

że rozpuszczanie soli mineralnych oraz jonizacja elektrolitów. W żołądku mięśniowym dochodzi do roztarcia i wymieszania pokarmu z enzymami trawiennymi pochodzącymi z żołądka gruczołowego. Całkowita długość przewodu pokarmowego ptaków nie przekracza 5-krotnej długości ich ciała [2]. W skład jelita cienkiego drobiu wchodzi: dwunastnica, jelito czcze oraz jelito biodrowe. Dwunastnica łączy żołądek mięśniowy z jelitem czczym. Końcowy proces trawienia oraz absorpcja składników pokarmowych odbywa się w jelicie czczym i biodrowym.

Mikrobiota przewodu pokarmowego drobiu stanowi złożony ekosystem, a jego równowaga jest niezwykle ważna dla zachodzących procesów trawienia oraz wchłaniania pokarmów, a więc dla zdrowia i prawidłowego funkcjonowania ptaków [10]. W składzie mikrobioty przewodu pokarmowego zdrowego ptaka znajdują się głównie bakterie z rodzajów: *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* oraz paciorkowce i enterobakterie [10]. Jednym z wielu czynników mających wpływ na skład mikrobioty układu pokarmowego drobiu jest rodzaj podawanej paszy, jak również dodatków paszowych. Probiotyki, czyli żywe mikroorganizmy, które po podaniu w odpowiedniej ilości wywołują korzyści zdrowotne w organizmie gospodarza, są przykładem dodatków paszowych dla drobiu [7]. W procesie selekcji szczepy probiotyczne muszą jednak spełniać wiele kryteriów, m.in. wykazywać zdolność do przetrwania i utrzymania aktywności metabolicznej oraz wzrostu w układzie pokarmowym [5, 6].

Celem pracy była ocena przeżywalności probiotycznych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z dodatkiem paszy lub bez jej udziału w warunkach modelowych, symulujących wybrane odcinki przewodu pokarmowego drobiu (wole, żołądek, jelito cienkie).

Material i metody badań

Material biologiczny stanowiły szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, które wchodziły w skład trzech nowo opracowanych preparatów probiotycznych A, B i C (tab. 1).

Tabela 1. Skład preparatów probiotycznych A, B i C
Table 1. Composition of A, B and C probiotic preparations

A	B	C
<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094	<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094	<i>Lb. paracasei</i> ŁOCK 1091
<i>Lb. plantarum</i> ŁOCK 0860	<i>Lb. plantarum</i> ŁOCK 0860	<i>Lb. pentosus</i> ŁOCK 1094
<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092	<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092	<i>Lb. plantarum</i> ŁOCK 0860
<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119	<i>Lb. rhamnosus</i> ŁOCK 1087	<i>Lb. reuteri</i> ŁOCK 1092
	<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119	<i>Lb. rhamnosus</i> ŁOCK 1087
		<i>S. cerevisiae</i> ŁOCK 0119

Szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* zostały wyizolowane z kiszzonek roślinnych (*Lb. plantarum* ŁOCK 0860) i treści jelitowej zwierząt monogastrycznych (*Lb. pentosus* ŁOCK 1094, *Lb. reuteri* ŁOCK 1092, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 1087, *Lb. paracasei* ŁOCK 1091), natomiast drożdże *S. cerevisiae* ŁOCK 0119 pochodziły ze środowiska gorzelniczego. Wszystkie użyte w badaniach szczepy probiotyczne zostały zdeponowane w Łódzkiej Kolekcji Czystych Kultur (ŁOCK 105) Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechniki Łódzkiej. Właściwości probiotyczne tych szczepów zostały opisane w zgłoszeniach [13 - 17] i opisie patentowym [18]. Skład poszczególnych preparatów ustalono na podstawie wyników badań dotyczących właściwości probiotycznych każdego z użytych mikroorganizmów. Zastosowanie odpowiednio: 3, 4 i 5 szczepów bakterii *Lactobacillus* w składzie mieszanek miało na celu sprawdzenie, która z kombinacji pozwoli na uzyskanie największej sumarycznej przeżywalności probiotyków w układzie pokarmowym drobiu.

W celu określenia przeżywalności bakterii *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w trakcie procesu trawienia zastosowano model *in vitro* układu pokarmowego drobiu, za pomocą którego odzwierciedlano warunki wola, żołądka (gruczołowego i mięśniowego) oraz jelita cienkiego (tab. 2).

Tabela 2. Model *in vitro* układu pokarmowego drobiuTable 2. *In vitro* model of the digestive tract of poultry

Odcinek przewodu pokarmowego Section of digestion tract	Roztwór symulujący Simulating solution	Ilość roztworu Quantity of solution [ml]	Czas zalegania pokarmu Time of gastric content being retained [min]
Wole Crop	50 mM bufor octanowy 50 mM acetate buffer	15,00	30
Żołądek Gizzard	1 M roztwór kwasu solnego 1 M solution of hydrochloric acid roztwór pepsyny w buforze octanowym solution of pepsin in acetate buffer	1,40 2,60	45
Jelito cienkie Small intestine	roztwór wodny pankreatyny aqueous solution of pancreatin 1 M roztwór wodorowęglanu sodu 1 M solution of sodium bicarbonate	3,25 3,25	60

Objaśnienia / Explanatory notes:

Wartość pH matrycy w poszczególnych etapach badań ustalano roztworami 1 M wodorotlenku sodu oraz 1 M kwasu solnego / pH of matrix at individual test stages was determined using solutions of 1M sodium hydroxide and 1 M hydrochloric acid.

Źródło / Source: opracowanie własne na podstawie [9, 11, 19] / the authors' own study based on [9, 11, 19].

Szczepy probiotyczne bakterii *Lactobacillus* i drożdży aktywowane w podłożach płynnych (odpowiednio MRS i YPG) bez dodatków paszowych (próby A, B i C) oraz z dodatkiem standardowej paszy dla drobiu (próby A+pasza, B+pasza i C+pasza) poddawano pasażowi w warunkach symulujących przewód pokarmowy drobiu. Trawienie treści pokarmowej inicjowano przez mieszanie badanych prób z buforem octanowym w ciągu 30 min (wole). Następnie dodawano kolejno soki żołądkowe i jelitowe w celu symulowania procesów trawienia odpowiednio w żołądku (45 min) i w jelicie cienkim (60 min). W każdym etapie badaną mieszaninę inkubowano w temp. 37 °C w warunkach ciągłego mieszania (150 obr./min) na wytrząsarce obrotowej w celu zapewnienia jednorodnego rozkładu wszystkich składników. Na początku każdego z odcinków przewodu pokarmowego oraz po upływie czasu zalegania pokarmu pobierano próbki do badań mikrobiologicznych. Metodą hodowlaną, w trzech powtórzeniach, wykonywano posiewy ilościowe z odpowiednich rozcieńczeń. W analizie zastosowano selektywne podłoża mikrobiologiczne i warunki inkubacji odpowiednie dla bakterii (MRS z nystatyną, temp. 37 °C, 2 dni) oraz drożdży (YPG z chloramfenikolem, temp. 30 °C, 5 dni). Po zakończonej inkubacji zliczano kolonie wyrosłe na płytkach i oceniano przeżywalność badanych mikroorganizmów probiotycznych w modelowym układzie pokarmowym drobiu.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Normalność rozkładu zmiennych analizowano testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Bartletta. Po potwierdzeniu rozkładu normalnego i jednorodności wariancji wyniki dotyczące liczby mikroorganizmów probiotycznych analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (One-Way ANOVA) w zależności od sposobu podania odpowiedniej mieszaniny probiotycznej. Natomiast procentową przeżywalność mikroorganizmów w modelowym układzie pokarmowym drobiu analizowano wieloczynnikową analizą wariancji (Multi-Way ANOVA) w zależności od rodzaju i sposobu podania mieszanki probiotycznej oraz etapu transferu. Istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya ($p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono w programie XLSTAT (Addinsoft SARL, Paryż, Francja).

Wyniki i dyskusja

Przeżywalność bakterii z rodzaju Lactobacillus spp.

Początkowa liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. w badanych próbkach wynosiła $1,00 \times 10^9 \div 1,95 \times 10^9$ jtk/ml (rys. 1).

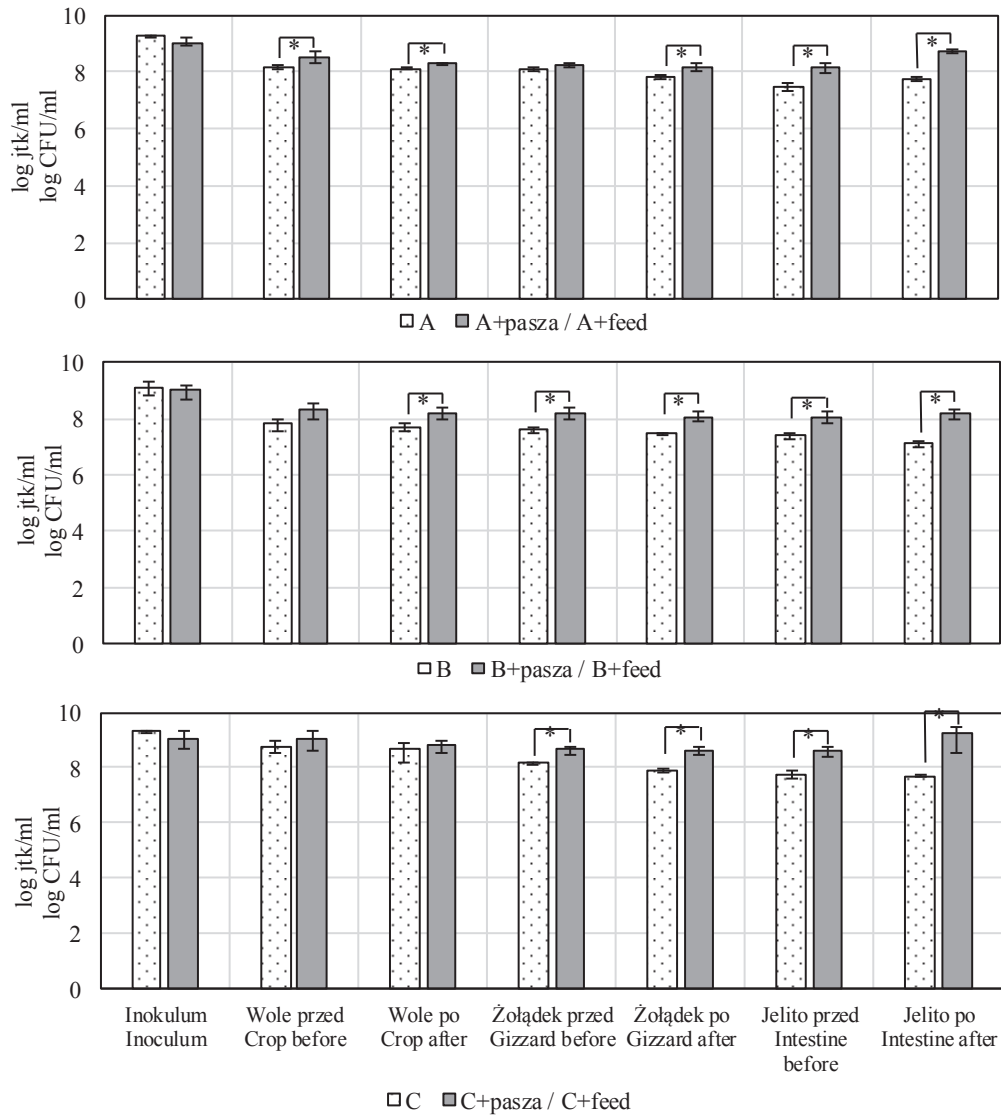
Pierwszym badanym odcinkiem przewodu pokarmowego w warunkach modelowych było wole, w którym czas zalegania pokarmu był najkrótszy i wynosił 30 min. W przypadku mieszanki C obniżenie liczby bakterii po inkubacji było nieznaczne (do $4,83 \times 10^8$ i $6,74 \times 10^8$ jtk/ml odpowiednio: bez dodatku paszy oraz z jej udziałem).

Natomiast w przypadku próby A bez dodatku paszy, jak i z jej dodatkiem, liczba ta obniżyła się średnio o 1 rząd wielkości (do 1,30 i $2,06 \times 10^8$ jtk/ml). Znaczne obniżenie liczby bakterii *Lactobacillus* spp. (o 1,5 i 1 rząd wielkości) zaobserwowano w przypadku mieszanki B bez dodatku paszy, jak i z jej dodatkiem (do $5,13 \times 10^7$ i $1,52 \times 10^8$ jtk/ml) – rys. 1.

Pomimo niekorzystnych warunków panujących w żołądku w przypadku zastosowania mieszanki A liczba bakterii po 45 min nie obniżyła się znacząco w stosunku do poprzedniego odcinka pokarmowego. Stwierdzono ponadto, że liczba bakterii *Lactobacillus* spp. była statystycznie istotnie wyższa w przypadku dodatku paszy ($1,50 \times 10^8$ jtk/ml) w porównaniu z samą mieszanką bakterii ($7,00 \times 10^7$ jtk/ml). Po zastosowaniu mieszanki C nastąpiło obniżenie liczby bakterii do poziomu $8,16 \times 10^7$ jtk/ml, natomiast najbardziej znaczące obniżenie, do $2,99 \times 10^7$ jtk/ml, odnotowano w przypadku mieszanki B. Podobnie jak poprzednio, dodatek paszy wpłynął na statystycznie istotnie wyższą (średnio o 0,7 rzędu wielkości) liczbę bakterii w mieszance C oraz o 0,5 rzędu wielkości – w mieszance B (rys. 1).

Po 60 min zalegania pokarmu w warunkach symulujących jelito cienkie stwierdzono obniżenie liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do poziomu $5,05 \times 10^7$ jtk/ml i $1,29 \times 10^7$ jtk/ml w przypadku odpowiednio: mieszanki C i B. W wyniku trawienia mieszanki A odnotowano natomiast wzrost liczby tych bakterii średnio o 3,8 % (do $6,00 \times 10^7$ jtk/ml), co jest pozytywnym zjawiskiem (rys. 1, tab. 3). Dodatek paszy spowodował, że liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* po trawieniu w warunkach symulujących układ pokarmowy drobiu wzrosła statystycznie istotnie do poziomu $1,55 \times 10^8$ jtk/ml (B+pasza), $5,13 \times 10^8$ jtk/ml (A+pasza) i $1,72 \times 10^9$ jtk/ml (C+pasza) w porównaniu z próbą bez paszy (rys. 1). Udział bakterii *Lactobacillus* spp. na tym etapie wzrósł odpowiednio o: 8 % (A+pasza), 3 % (B+pasza) i 25 % (C+pasza) w porównaniu z próbami bez dodatku paszy (tab. 3).

W przypadku mieszanek A i B poddanych trawieniu w warunkach symulujących układ pokarmowy drobiu przeżywalność bakterii *Lactobacillus* spp. po zakończeniu pasaży wynosiła odpowiednio: 84,2 i 78,0 %. Dodatek paszy spowodował wzrost przeżywalności bakterii odpowiednio o 14,1 i 13,1 % (tab. 3). W przypadku mieszanki C, zawierającej w swoim składzie największą liczbę szczepów probiotycznych, stwierdzono najwyższą przeżywalność tych bakterii wynoszącą na koniec pasaży nawet 107,3 % w przypadku dodatku paszy, która stymulowała wzrost bakterii. Dodatek czynnika ochronnego, jaki stanowiła pasza, miał zatem statystycznie istotny wpływ na wzrost przeżywalności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w warunkach symulujących odcinki przewodu pokarmowego (rys. 1, tab. 3).



Objaśnienia / Explanatory notes:

przed i po – oznacza poszczególne odcinki układu pokarmowego przed inkubacją i po niej / before and after – means individual section of digestive tract before and after incubation. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); * – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) / statistically significant differences ($p < 0.05$).

Rys. 1. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus* spp. w modelu *in vitro* układu pokarmowego drobiu

Fig. 1. Survivability of *Lactobacillus* spp. in *in vitro* model of digestive tract of poultry

Tabela 3. Udział bakterii *Lactobacillus* spp. w modelowym układzie pokarmowym drobiu przed trawieniem i po nimTable 3. Content of *Lactobacillus* spp. in model digestive tract of poultry before and after digestion

Etap Step		Udział bakterii <i>Lactobacillus</i> spp. / Content of <i>Lactobacillus</i> spp. [%]					
		A	A+pasza A+feed	B	B+pasza B+feed	C	C+pasza C+feed
Inokulum Inoculum		100,0 ± 0,0 B					
Wole Crop	przed before	88,2 ± 0,2 FGHIJKL	94,0 ± 1,6 ABCDEF	88,6 ± 2,2 FGHIJKL	92,1 ± 0,1 DEFGH	92,7 ± 1,1 CDEFGH	99,3 ± 0,6 B
	po after	87,5 ± 0,7 GHIJKLM	93,1 ± 2,3 CDEFG	86,8 ± 3,9 HIJKLMN	90,2 ± 1,5 FGHIJ	89,7 ± 3,3 FGHIJK	97,1 ± 2,4 BCDE
Żołądek Gizzard	przed before	87,0 ± 0,7 GHIJKLMN	91,9 ± 1,8 DEFGH	85,1 ± 3,5 IJKLMNO	89,9 ± 1,8 FGHIJK	87,6 ± 0,2 GHIJKLM	98,2 ± 0,2 BC
	po after	84,3 ± 0,2 JKLMNO	90,5 ± 1,1 FGHI	82,7 ± 2,9 LMNOP	88,4 ± 2,6 FGHIJKL	84,0 ± 0,4 KLMNOP	98,0 ± 0,1 BCD
Jelito cienkie Small intestine	przed before	80,4 ± 0,3 OP	90,3 ± 1,1 FGHIJ	81,1 ± 1,5 NOP	88,1 ± 2,4 FGHIJKL	83,3 ± 0,7 LMNOP	97,7 ± 0,3 BCD
	po after	84,2 ± 0,2 JKLMNO	98,3 ± 2,3 BC	78,0 ± 4,4 P	91,1 ± 4,1 EFGHI	81,9 ± 0,5 MNOP	107,3 ± 2,6 A

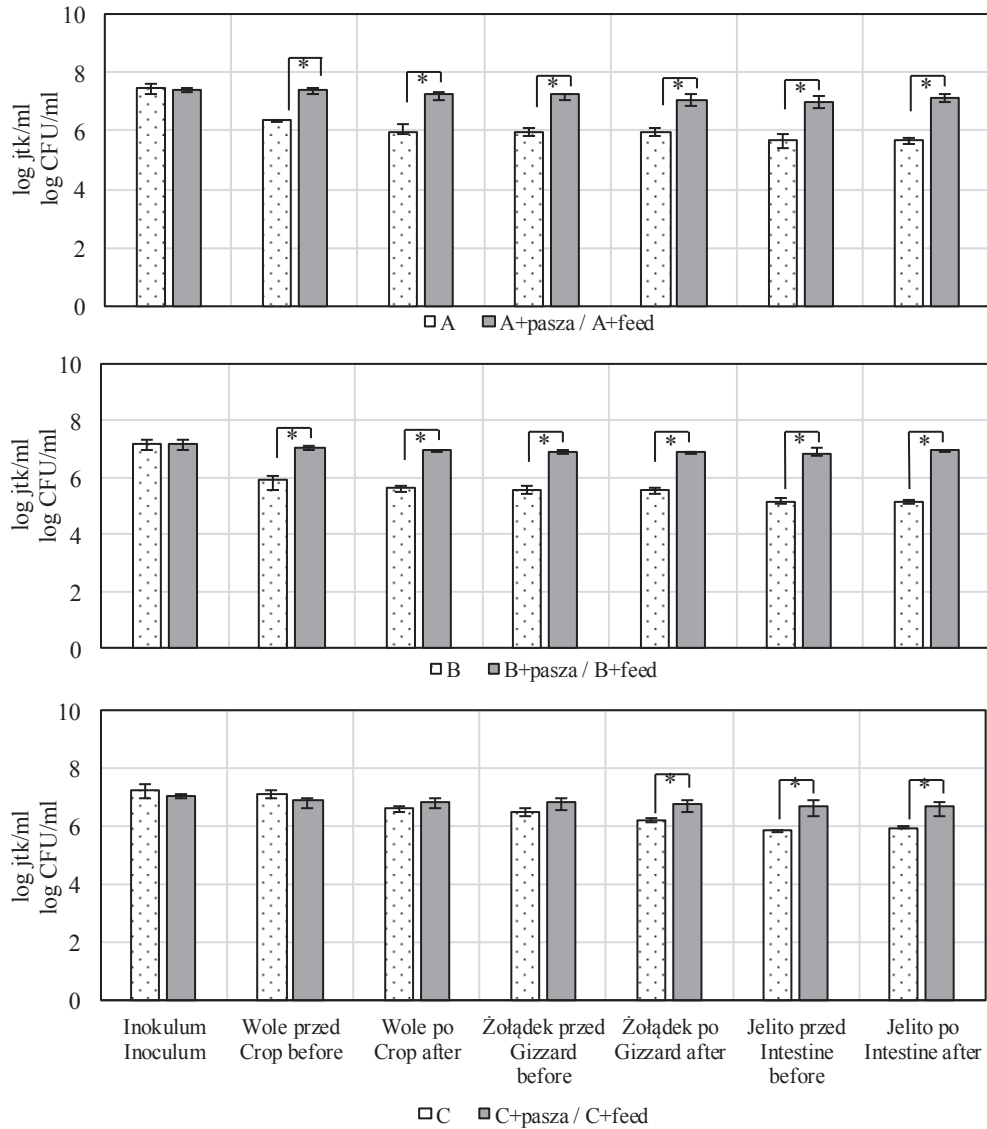
Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations. Wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie w zależności od rodzaju i sposobu podania mieszanki probiotycznej oraz etapu transferu ($p < 0,05$) / Mean values denoted by different letters differ statistically significantly depending on type and way of administering probiotic mixture and on transfer step ($p < 0.05$).

Warto zaznaczyć, że każda z badanych mieszanek probiotycznych początkowo charakteryzowała się taką samą liczbą bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Różnice dotyczyły liczby szczepów bakterii *Lactobacillus* spp. Otrzymane wyniki wskazują na najwyższą przeżywalność mieszanki C, zawierającej w składzie 5 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (np. szczep *Lb. paracasei* ŁOCK 1091 nieobecny w składzie pozostałych mieszanek). Korzystny efekt obserwowany był szczególnie w przypadku podania mieszanek probiotycznych wraz z paszą. Prawdopodobnie za takie działanie może odpowiadać zastosowanie największej liczby różnych szczepów i efekt synergistyczny pomiędzy nimi. Dokładne wyjaśnienie mechanizmów zachodzących pomiędzy poszczególnymi szczepami jest jednak bardzo trudne i wymaga dalszych badań.

Przeżywalność drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Początkowa liczba drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wynosiła $1,04 \times 10^7 \div 2,61 \times 10^7$ jtk/ml (rys. 2).



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as in Fig. 1.

Rys. 2. Przeżywalność drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu *in vitro* układu pokarmowego drobiu

Fig. 2. Survivability of *Saccharomyces cerevisiae* in *in vitro* model of digestive tract of poultry

Po 30 min inkubacji mieszanki C w warunkach symulujących wole liczba drożdży uległa obniżeniu do poziomu odpowiednio: $4,00 \times 10^6$ i $7,40 \times 10^6$ jtk/ml w przypadku braku paszy bądź jej dodatku. W mieszankach A i B zaobserwowano natomiast

obniżenie liczby drożdży o 1,5 rzędu wielkości. Dodatek paszy spowodował natomiast statystycznie istotny wzrost liczby drożdży do poziomu $1,76 \times 10^7$ jtk/ml (mieszanka A) oraz $9,80 \times 10^6$ jtk/ml (mieszanka B) – rys. 2.

Pomimo niekorzystnych warunków panujących w żołądku, również liczba drożdży nie uległa znaczącemu obniżeniu i wynosiła: $3,61 \times 10^5$ jtk/ml (mieszanka B), $9,00 \times 10^5$ jtk/ml (mieszanka A) i $1,71 \times 10^6$ jtk/ml (mieszanka C). Dodatek paszy spowodował, że liczba drożdży *S. cerevisiae* była statystycznie istotnie wyższa i wynosiła: $5,54 \times 10^6$ jtk/ml (C+pasza), $7,80 \times 10^6$ jtk/ml (B+pasza) i $1,15 \times 10^7$ jtk/ml (A+pasza) – rys. 2.

Zarówno w przypadku mieszanki A, B, jak i C obserwowano wzrost liczby drożdży o: 5,1 i 1,9 % (odpowiednio: mieszanka A+pasza, mieszanka A), 3,4 i 1,3 % (odpowiednio: mieszanka B+pasza, mieszanka B) oraz 1,7 % (mieszanka C) podczas inkubacji w warunkach symulujących jelito cienkie (tab. 4).

W przypadku mieszanek probiotycznych poddanych trawieniu bez paszy udział drożdży po zakończeniu pasażu wynosił średnio 69,4 % (mieszanka B), 72,7 % (mieszanka A) i 80,5 % (mieszanka C). Dodatek paszy miał natomiast statystycznie istotny wpływ na zwiększenie przeżywalności drożdży (tab. 4).

Tabela 4. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelowym układzie pokarmowym drobiu
Table 4. Content of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in model digestive tract of poultry

Etap Step	Udział drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Content of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast [%]						
	A	A+pasza A+feed	B	B+pasza B+feed	C	C+pasza C+feed	
Inokulum Inoculum	100,0 ± 0,0 A						
Wole Crop	przed before	85,0 ± 1,4 DEFG	99,3 ± 1,0 A	83,1 ± 3,3 FG	99,1 ± 1,6 A	98,4 ± 1,4 AB	96,3 ± 2,2 ABC
	po after	78,6 ± 1,2 GHIJ	97,5 ± 0,7 AB	78,5 ± 2,7 GHIJ	98,6 ± 2,4 AB	89,7 ± 5,2 BCDEF	95,8 ± 2,7 ABC
Żołądek Gizzard	przed before	78,3 ± 0,6 GHIJ	95,6 ± 1,8 ABC	77,0 ± 3,6 GHIJK	97,4 ± 1,7 ABC	88,2 ± 5,3 CDEF	95,3 ± 3,0 ABC
	po after	77,2 ± 1,5 GHIJK	93,6 ± 0,0 ABCDE	76,6 ± 3,3 GHIJK	96,8 ± 2,1 ABC	84,3 ± 4,7 EFG	94,2 ± 3,2 ABCD
Jelito cienkie Small intestine	przed before	70,8 ± 5,2 IJK	92,9 ± 0,2 ABCDE	68,2 ± 4,9 K	95,0 ± 3,6 ABC	78,8 ± 3,6 GHI	93,2 ± 4,0 ABCDE
	po after	72,7 ± 4,5 HIJK	97,9 ± 3,8 AB	69,4 ± 1,0 JK	98,4 ± 2,0 AB	80,5 ± 3,5 FGH	92,5 ± 2,8 ABCDE

Objaśnienia jak pod tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono nieznaczne zmniejszenie przeżywalności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* obecnych w mieszankach A, B i C podczas pasażu w warunkach symulujących żołądek. Wyniki te wskazują na wysoką tolerancję tych mikroorganizmów na sok żołądkowy i niskie pH, co jest zjawiskiem bardzo korzystnym. Wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych wcześniej w celu określenia właściwości probiotycznych zastosowanych szczepów potwierdziły ich odporność na niskie pH i sole żółci. Tolerancja szczepów na warunki panujące w żołądku stwierdzona natomiast w niniejszych badaniach pozwala na dodatkowe potwierdzenie kluczowych właściwości probiotycznych badanych szczepów.

Warto zaznaczyć, że liczba bakterii *Lactobacillus* spp. wzrastała podczas inkubacji w warunkach jelita cienkiego mieszanki A (zarówno bez dodatku paszy, jak i z jej udziałem), natomiast w przypadku mieszanek B i C – tylko z dodatkiem paszy. Również w przypadku drożdży na tym etapie transferu obserwowano zwiększenie ich liczby.

Podobne obserwacje opisano w badaniu przeżywalności przetrwalników bakterii *Bacillus* spp. DFM (ang. *as directfed microbials*) w warunkach symulujących przewód pokarmowy drobiu. Niezależnie od składu paszy zaobserwowano obniżenie liczby przetrwalników bakterii w żołądku oraz ich wzrost (nawet o 2 rzędy wielkości) w części jelitowej [9].

Przeżywalność mikroorganizmów probiotycznych może również zależeć od postaci, w jakiej są podawane (forma utrwalenia oraz rodzaj matrycy) [9]. Musikasang i wsp. [12] wykazali ochronny wpływ mikrokapsułkowania szczepu bakterii *Enterococcus durans* KT3L20 w modelu *in vitro* układu pokarmowego drobiu. Stwierdzili, że metoda ta powoduje zwiększenie przeżywalności tego szczepu średnio o 1 rząd wielkości [12]. Przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w żołądku może wzrosnąć w obecności produktów żywnościowych lub paszowych, które mają wpływ na wartość pH i mogą chronić komórki przed wpływem pepsyny i kwasu żołądkowego [1]. W badaniach własnych wykazano ochronny wpływ paszy na przeżywalność bakterii *Lactobacillus* spp. i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach symulujących przewód pokarmowy drobiu.

Wnioski

1. Stwierdzono, że szczepy bakterii *Lactobacillus* spp. oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae* zastosowane w mieszankach probiotycznych A, B i C wykazują wysoką przeżywalność w symulowanym układzie pokarmowym drobiu.
2. Dodatek paszy stanowi czynnik ochronny i ma korzystny wpływ na zwiększenie przeżywalności bakterii, zwłaszcza w warunkach jelita cienkiego.

3. Wysoka przeżywalność mikroorganizmów *Lactobacillus* spp. oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w modelu *in vitro* układu pokarmowego może wskazywać na ich potencjalne zastosowanie jako komponentów preparatów probiotycznych i umożliwić kontynuację badań w warunkach *in vivo*.

Projekt został częściowo sfinansowany ze środków Funduszu Młodych Liderów Nauki, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej oraz grantu NCBIR o numerze PBS3/A8/32/2015.

Literatura

- [1] Bergamini C.V., Hynes E.R., Quiberoni A., Suarez V.B., Zalazar C.A.: Probiotic bacteria as adjunct starters: Influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Res Int.*, 2005, 38, 597-604.
- [2] Biavati B., Mattarelli P.: *Bifidobacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Hoboken 2015. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00019.
- [3] Burni D., Hoare B., DiCostanzo J., BirdLife International, Benstead P. (Red.): *Ptaki*. Encyklopedia. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2009.
- [4] Denbow M.D.: Gastrointestinal anatomy and physiology. Chapter 12. In: *Sturkie's Avian Physiology*. 5th ed. Ed. G. C. Whittow. Academic Press, San Diego 2000, pp. 299-324.
- [5] European Food Safety Authority (EFSA): Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.*, 2005, 226, 1-12.
- [6] FAO/WHO: *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. FAO/WHO, London, Canada, 2002.
- [7] Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E.: Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014, 11, 506-514.
- [8] Klingberg T.D., Budde B.B.: The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 109, 157-159.
- [9] Latorre J.D., Hernandez-Velasco X., Kuttappan V.A., Wolfenden R.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Bielke L.R., Prado-Rebolledo O.F., Morales E., Hargis B.M., Tellez G.: Selection of *Bacillus* spp. for cellulase and xylanase production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and *Clostridium perfringens* proliferation using an *in vitro* digestive model in different poultry diets. *Front. Vet. Sci.*, 2015, 2, #25. DOI: 10.3389/fvets.2015.00025.
- [10] Lu I., Idris U., Hormon B.: Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 6816-6824.
- [11] Menezes-Blackburn D., Gabler S., Greiner R.: Performance of seven commercial phytases in an *in vitro* simulation of poultry digestive tract. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63 (27), 6142-6149.
- [12] Musikasang H., Tani E.A., H-kittikun A., Maneerat S.: Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 25, 1337-1345.

- [13] Śliżewska K., Chlebicz A.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus paracasei*. Zgłoszenie patentowe nr 422603, 2017.
- [14] Śliżewska K.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus pentosus*. Zgłoszenie patentowe nr 422589, 2017.
- [15] Śliżewska K.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus reuteri*. Zgłoszenie patentowe nr 422593, 2017.
- [16] Śliżewska K.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus rhamnosus*. Zgłoszenie patentowe nr 422602, 2017.
- [17] Śliżewska K.: Szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Zgłoszenie patentowe nr 422709.
- [18] Śliżewska K., Motyl I., Libudzisz Z., Otlewska A., Burchardt H., Klecha J., Henzler J.: Szczep bakterii mlekowych *Lactobacillus plantarum*. Zgłoszenie patentowe nr 401554. Opis patentowy nr PL 221 959 B1, 2012.
- [19] Versantvoort C.H., Oomen A.G., Van de Kamp E., Rompelberg C.J., Sips A.J.: Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.*, 2005, 43 (1), 31-40.
- [20] Zawadzki W., Króliczewska B.: Specyfika pobierania, trawienia i metabolizmu składników pokarmowych u ptaków. W: Choroby drobiu. Red. M. Mazurkiewicz. Wyd. UP we Wrocławiu, Wrocław 2011, ss. 40-59.

SURVIVABILITY OF PROBIOTIC MICROORGANISMS IN *IN VITRO* MODEL OF POULTRY DIGESTIVE TRACT

S u m m a r y

The objective of the research study was to assess the survivability of probiotic strains of *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae* under the model conditions that simulated selected sections of the digestive tract of poultry. The strains tested were administered to the animals without feed or with feed. The microorganisms as named above are included in the newly developed probiotic mixtures (A, B and C). The survivability of the bacteria and yeasts tested under the simulated conditions of the crop, gizzard and small intestine was determined using a culture method. Initially the average count of *Lactobacillus* spp. was $1.00 - 1.95 \times 10^9$ CFU/ml, while the average count of yeast was $1.04 - 3.00 \times 10^7$ CFU/ml. As a result of the passage of samples without feed, the count of bacteria and yeast was reduced in the subsequent sections of the simulated digestive tract; in the small intestine it was, on average, 2 orders of magnitude lower. However in the case of the feed with probiotic mixtures, the count of *Lactobacillus* spp. in the small intestine was, on average, 1 order of magnitude higher and that of yeast, on average, 1.5 orders of magnitude higher compared to the mixtures without feed. Thus, the added feed constituted a protective factor against the adverse conditions of the environment of digestive tract under the model study. Based on the results obtained, it is concluded that probiotic mixtures may be potentially applied as an additive in feeds intended for poultry.

Key words: probiotics, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, digestive tract, poultry 