

*Т.И. Дымар, Л.Л. Богданова, Т.А. Савельева, к.в.н., Н.Н. Фурик, к.т.н.
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»*

**ПОДБОР ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР
ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ
НА ИХ ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНЦЕНТРАТА
ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ЗАМЕНИТЕЛЯ ЦЕЛЬНОГО МОЛОКА**

Подобраны штаммы лакто- и бифидобактерий, обладающие спектром производственно-ценных и ветеринарно-значимых свойств, в состав пробиотического бактериального концентрата для обогащения ЗЦМ.

Введение. Эффективное ведение животноводства неразрывно связано с выращиванием молодняка с высоким потенциалом продуктивности, так как правильное кормление является основой получения высокопродуктивного стада. Телят с рождения и до окончания молочного периода в основном кормят жидкими кормами: сначала молозивом, потом молоком или его заменителем. К сожалению, на протяжении молозивного и молочного периода из-за нарушений ветеринарно-санитарных условий содержания, снижения иммунитета при нарушении микрофлоры желудочно-кишечного тракта вследствие антибиотикотерапии у телят могут возникнуть диспепсии и энтериты, которые приводят к обезвоживанию организма и нередко к гибели. Применение антибиотиков для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний и стимуляции роста молодняка зачастую приводит также к селекции и циркуляции в хозяйствах условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, обладающих повышенной резистентностью к антибиотикам. Это обуславливает увеличение роста инфекционных заболеваний молодняка животных, при которых происходит срыв метаболических процессов, развивается дисбактериоз, снижаются темпы роста, падает сохранность поголовья. Для стабилизации здоровья телят используют как фармацевтические препараты и кормовые антибиотики, так и иммуноглобулины, пребиотики и пробиотики.

Пробиотические микроорганизмы – специально подобранные штаммы лакто- и бифидобактерий, вырабатывающие молочную кислоту

и биологически активные соединения. Пробиотики колонизируют эпителий кишечника телят, предохраняя от заселения патогенными бактериями, содействуют процессам пищеварения, регулируют обмен веществ, синтезируют витамины и некоторые незаменимые аминокислоты, обезвреживают токсические вещества и стимулируют иммунную систему, что позволяет улучшить сопротивление организма по отношению к инфекциям. Нормализация микрофлоры кишечника молодняка животных с помощью пробиотиков является самой безопасной для животных, а также и для людей, потребляющих продукцию животноводства, и одновременно самой эффективной. Поэтому использование пробиотиков в технологии выращивания молодняка крупного рогатого скота – наиболее современный способ профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Механизм действия пробиотиков, в отличие от антибиотиков, направлен не на уничтожение, а на конкурентное исключение условно-патогенных бактерий из состава микробного биоценоза и на повышение колонизации кишечника нормальной микрофлорой.

Многочисленными исследованиями показано, что включение пробиотиков в систему выращивания молодняка животных снижает заболеваемость, сокращает продолжительность выращивания, сокращает затраты кормов, повышает сохранность животных [1, 2].

Научно доказано, что ацидофильные микроорганизмы и бифидобактерии являются представителями нормальной микрофлоры кишечника. Ацидофильные палочки – активные кислотообразователи, снижающие рН питательной среды в процессе развития до 4,3–3,8. Кроме того, они способны продуцировать антибиотические вещества: ацидофилин и лактоцидин, подавляющие рост гнилостных бактерий, стрептококков и стафилококков, возбудителей брюшного тифа, паратифов, туберкулеза, дизентерии и дифтерии [3]. Антагонистическая активность бифидобактерий связана с продуцированием ими органических кислот (ацетата и лактата) и бактериоцинов с широким спектром антимикробного действия (ингибируют рост кишечных палочек, клостридий, сальмонелл, шигелл, листерий, вибрионов и др.), блокированием рецепторов на слизистой кишечника, предотвращающим фиксацию на них потенциально патогенных микроорганизмов [4–5]. Известно, что культуры *L. plantarum* образуют антибиотикоподобное вещество – лактолин, задерживающее рост

бактерий рода *Clostridia* и дрожжей р. *Candida*, а *L. casei* обладают антагонистическими свойствами по отношению к кишечной и сенной палочкам, к бактериям тифа и дизентерии и дрожжам р. *Candida* [6].

В последние годы в состав кормов для молодняка животных (ЗЦМ, комбикорм, силос) все активнее вводят пребиотики и бактериальные препараты пробиотических микроорганизмов (лакто- и бифидобактерий).

Цель настоящих исследований – является подбор пробиотических культур лакто- и бифидобактерий для создания бактериального концентрата, предназначенного для обогащения заменителя цельного молока (ЗЦМ). Важными критериями отбора являются антагонистическая активность в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры, устойчивость к применяемым в ветеринарии антибиотикам, хорошие технологические характеристики культур лакто- и бифидобактерий.

Материалы и методы исследований. Объектом исследований явились штаммы лактобактерий (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus casei*) и бифидобактерий.

Отбор пробиотических культур лакто- и бифидобактерий в состав консорциума проводили в два этапа.

На первом этапе отобранные культуры исследованы по основным производственно-ценным свойствам, необходимым для получения бактериального концентрата, *на втором* – изучены основные ветеринарно-значимые свойства (антагонистическая активность в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры и устойчивость к применяемым в ветеринарии антибиотикам), определяющие пробиотическую ценность культур. Наряду с этим, проводились исследования по определению устойчивости лактобацилл и бифидобактерий к химическим агентам (поваренной соли и желчи) – как косвенному признаку приживаемости в кишечнике молодняка крупного рогатого скота.

Исследования проводили по общепринятым микробиологическим методикам, активность роста определяли по титрам в КОЕ/см³.

Изучение основных производственно-ценных свойств лактобацилл и бифидобактерий проводили по следующим показателям: активная ки-

слотность; предел кислотообразования в молоке; накопление биомассы (титр клеток, КОЕ/мл); микроскопический препарат.

Свойства изучали при выращивании культур в стандартных питательных средах. Для лактобацилл использовали среду *МРС*, для бифидобактерий – гидролизатно-молочную среду *ГМС*. Исследования проводили после культивирования в течение (16 ± 1) ч при инокуляции 1%-ом посевного материала. Предельную кислотность определяли после выращивания культур в стерильном обезжиренном молоке в течение 7 сут.

Изучение основных ветеринарно-значимых свойств проводили по следующим показателям: устойчивость к антибиотикам, антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, устойчивость к химическим агентам (поваренной соли, желчи).

Устойчивость к антибиотикам определяли дисковым методом. По величине зоны задержки роста судили о степени чувствительности культуры к данному антибиотику.

Исследование антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проводили в РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. Вышелесского». Антагонистическую активность определяли «чашечным методом» по зонам задержки роста тест-культуры.

Устойчивость лактобацилл и бифидобактерий к химическим агентам определяли путем выращивания культур в питательной среде, содержащей необходимую концентрацию химического агента, при оптимальной для данного вида температуре.

Результаты и их обсуждение.

I этап. Изучение основных производственно-ценных свойств проводили с целью выбора культур лакто- и бифидобактерий, обладающих хорошими технологическими характеристиками, необходимыми при производстве бактериальных концентратов. Свойства штаммов, выбранных в состав бактериального концентрата, представлены в табл. 1.

Для производства бактериального концентрата важна урожайность клеток. Из табл. 1 видно, что в состав бактериального концентрата выбраны штаммы, накапливающие в питательной среде высокое количество клеток в 1мл за 16 ч культивирования при инокуляции 1%-ом посе-

ного материала, значительно снижая активную кислотность среды. Штаммы *Lactobacillus helveticus* продуцируют максимальное количество кислоты, понижая активную кислотность питательной среды до значения рН 4,3, предел кислотообразования в молоке для этих культур составляет 320–390 Т.

Таблица 1 – Основные производственно-ценные свойства лактобацилл и бифидобактерий

№ штамма	Показатели, характеризующие рост культуры в питательной среде *		Предельная кислотность в молоке, Т	Микроскопический препарат
	титр клеток, КОЕ/мл	активная кислотность, рН		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>				
1186 LA–AVF	8,0·10 ⁸	4,3	350	Палочки одиночные и объединенные в короткие цепочки
2649 TL–O	8,5·10 ⁸	4,4	255	Палочки одиночные и объединенные в короткие цепочки
<i>Lactobacillus helveticus</i>				
1191 TL–A	8,5·10 ⁸	4,3	390	Палочки одиночные и объединенные в короткие цепочки
2389 LA–AV	9,5·10 ⁸	4,3	320	Палочки одиночные и объединенные в короткие цепочки
<i>Lactobacillus casei</i>				
1196 ML–OFR	5,0·10 ⁸	4,8	151	Короткие тонкие палочки сгруппированные в цепочки
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
1180 ML–OF	8,5·10 ⁸	4,7	170	Короткие тонкие палочки
<i>Bifidobacterium ssp.</i>				
432 OR	8,0·10 ⁸	5,0	82	Тонкие изогнутые палочки с ветвлением, встречаются в виде римских пятерок
1200 OR	1,5·10 ⁹	4,9	90	Тонкие прямые и изогнутые палочки в скоплениях и одиночные с бифуркациями на концах

* – Определяются после культивирования в течение (16±1) часов при инокуляции 1%–ом посевного материала.

Штаммы, производственно-ценные свойства которых приведены в табл. 1, соответствуют предъявляемым к ним требованиям и могут быть использованы для изготовления бактериального концентрата.

II этап. Изучение основных ветеринарно-значимых свойств.

Устойчивость лактобацилл и бифидобактерий к химическим агентам (поваренной соли, желчи) важна, так как является косвенным признаком приживаемости в кишечнике.

Результаты определения устойчивости лактобацилл и бифидобактерий к химическим агентам представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Устойчивость лактобацилл и бифидобактерий к химическим агентам

№ штамма	Устойчивость к			
	2% NaCl	4% NaCl	6% NaCl	20% желчи
<i>Lactobacillus acidophilus</i>				
1186 LA-AVF	+	–	–	+
2649 TL-O	+	+	–	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>				
1191 TL-A	+	–	–	+
2389 LA-AV	+	–	–	+
<i>Lactobacillus casei</i>				
1196 ML-OFR	+	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
1180 ML-OF	+	+	+	+
<i>Bifidobacterium ssp</i>				
432 OR	+	–	–	+
1200 OR	+	–	–	+

Из табл. 2 следует, что все выбранные штаммы устойчивы к содержанию в питательной среде 20% желчи, штаммы *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus plantarum* – 6% поваренной соли, штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* и *Bifidobacterium ssp.* – 2% поваренной соли, а штамм *Lactobacillus acidophilus* 2649TL-O – 4% поваренной соли.

При подборе культур для получения препаратов пробиотического действия особое внимание уделяется антагонистической активности штаммов-пробиотиков в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры, а также устойчивости к антибиотикам, применяемым в ветеринарии. Благодаря этому пробиотики не только способствуют восстановлению нормальной микрофлоры кишечника, но и подавляют постороннюю микрофлору.

Устойчивость к антибиотикам определяли дисковым методом. По величине зоны задержки роста судили о степени чувствительности культуры к данному антибиотику. Штаммы, у которых зона задержки роста составляет менее 15 мм, считаются резистентными к данному антибиотику, 15–25 мм – слабая чувствительность, больше 25 мм – чувствительность сильная.

В табл. 3 представлены результаты определения чувствительности культур к антибиотикам.

Таблица 3 –Характеристика лактобацилл и бифидобактерий по чувствительности к антибиотикам

№ п/п	Название антибиотика	Зоны задержки роста культур, мм							
		<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1186 LA-AVF	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TL-O	<i>Lactobacillus helveticus</i> TL-A	<i>Lactobacillus helveticus</i> 2389 LA-AV	<i>Lactobacillus casei</i> 1196 ML-OFR	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1180 ML-OF	<i>Bifidobacterium ssp.</i> 432 OR	<i>Bifidobacterium ssp.</i> 1200 OR
1	Карбенициллин	22	30	–	24	18	14	26	30
2	Оксациллин	14	20	10	18	10	–	12	16
3	Офлоксацин	– *	–	–	10	16	10	15	12
4	Цефалексин	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	–	20	26
5	Клиндамицин	30	16	24	16	24	16	30	34
6	Цефатоксим	–	–	–	30	16	–	28	28
7	Рифампицин	14	Нет данных	–	12	16	11	26	14
8	Амикомицин	8	–	–	10	–	–	–	–
9	Тетрациклин	24	28	–	30	20	12	26	20
10	Стрептомицин	14	–	–	22	–	–	–	8
11	Полимиксин	–	–	–	–	–	–	–	–
12	Ампициллин	–	–	–	32	12	18	24	24
13	Норфлоксацин	–	–	–	–	–	–	–	–
14	Неомицин	10	Нет данных	–	12	–	8	–	–
15	Ципрофлоксацин	–	–	–	–	11	–	–	12
16	Линкомицин	26	35	–	20	16	–	28	28
17	Эритромицин	26	Нет данных	28	30	23	18	28	26
18	Метронидазол	–	Нет данных	–	–	–	–	12	–
19	Ципрофлоксацин	–	Нет данных	–	–	10	–	10	10
20	Ванкомицин	18	Нет данных	20	22	–	–	22	18
Среднее значение		19	25	21	21	16	13	22	20

* Прочерк «–» означает, что штамм не чувствителен к антибиотику.

В состав бактериальных концентратов выбраны штаммы резистентные либо обладающие слабой чувствительностью к содержанию в среде большинства исследованных антибиотиков.

Дальнейший выбор культур осуществляли исходя из результатов определения антагонистической активности в отношении патогенной и условно-патогенной флоры. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Антагонистическая активность лактобацилл и бифидобактерий в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

№ п/п	№ штамма	<i>Streptococcus porcinus</i>	<i>Streptococcus suis</i>	<i>Streptococcus equi</i>	<i>Staphylococcus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i> серовариант А	<i>Pasteurella multocida</i> серовариант D	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Hemophilus parasuis</i>	<i>Salmonella sholeraesuis</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Morganella</i>	Среднее значение
<i>Lactobacillus acidophilus</i>														
1	1186 LA-AVF	15	10,5	18	17	15	11,5	20,5	11	19,5	12,5	12,5	16	13,8
2	2649 TL-O	0	10,5	10	14,5	11,5	14	0	11	8	11	0	12	7,9
<i>Lactobacillus helveticus</i>														
3	1191 TL-A	10	11,5	13,5	12,5	22	12	0	19	12,5	13	0	13	10,7
4	2389 LA-AV	19	10	29,5	0	17,5	8,5	0	0	11	14,5	7,5	0	9,0
<i>Lactobacillus casei</i>														
5	1196 ML-OFR	17	13	22	0	10	0	0	0	22,5	0	12	13,5	8,5
<i>Lactobacillus plantarum</i>														
6	1180 ML-OF	0	14	16,5	0	21,5	13,5	0	20	16	15,5	10,5	8,5	10,5
<i>Bifidobacterium ssp.</i>														
7	432 OR	0	14	27,5	0	11,5	0	0	14	0	0	0	12,5	6,1
8	1200 OR	16	15	10	0	6,5	0	11	12	13,5	0	15,5	14,5	8,9

Примечание. Отсутствие или наличие антагонистической активности не является стабильным показателем и зависит от многих факторов: фазы роста того или иного микроорганизма, его формы (S, M, R, L-формы), степени патогенности (вирулентности), концентрации микробной взвеси, оптимума температуры (30–35°C, 37–38°C), pH среды и скорости роста (период одного деления клетки), типа дыхания клетки (аэроб, анаэроб, микроаэрофил) и много другое.

Включение штаммов с максимальной антагонистической активностью в отношении различных видов патогенной и условно–патогенной микрофлоры в состав консорциума для получения бактериального концентрата пробиотического действия, предназначенного для обогащения ЗЦМ, позволит получить кормовой продукт, обладающий пробиотическим действием в отношении ряда заболеваний молодняка крупного рогатого скота.

Заключение. В состав сухого бактериального концентрата отобраны культуры лактобацилл и бифидобактерий, резистентные к содержанию большинства антибиотиков в среде, обладающие антагонистической активностью в отношении различных видов патогенной и условно–патогенной микрофлоры. Использование этих культур обеспечит получение бактериального концентрата для обогащения заменителя цельного молока, обладающего пробиотическим действием.

Литература

1. Рябая, Н.Е. Пробиотики для животноводства и механизмы их лечебного действия / Н.Е. Рябая [и др.] // Ветеринарная наука – производству: сб. науч. тр. – Минск: РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. – 2005. – С. 448–449.

2. Бородич, Л.М. Определение антагонистической активности молочнокислых микроорганизмов к основным возбудителям субклинического мастита у коров / Л.М. Бородич [и др.] // Ученые записки, Т. 43, вып. 2 (июль–декабрь 2007). Витебск: УО «Витебская ордена «Знак Почета» Государственная академия ветеринарной медицины». – 2007. – С. 123–125.

3. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко – М. 1975. – С. 32–45, 58–65.

4. Лянная, А.М. Биологические и экологические особенности рода *Bifidobacterium* / А.М. Лянная, М.М. Интизаров, Е.Е. Донских // Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве. – М., 1986. С. 32–38.

5. Бойцов, А.Г. Как победить дисбактериоз у детей и взрослых / А.Г. Бойцов, В.Г. Лифляндский – М.: Олма-Пресс, 2002.

6. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров – Т. 2. – М.: Грант, 1998.

T. Dymar, L. Bogdanova, T. Savelyeva, N. Furik

**SELECTION OF MICROORGANISMS LACTOBACILLUS AND
BIFIDOBACTERIUM FOR CREATION ON THEIR BASIS OF THE
BACTERIAL CONCENTRATE FOR ENRICHMENT
OF THE SUBSTITUTE OF WHOLE MILK**

Summary

In structure of a dry bacterial concentrate cultures *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, resistant to the maintenance of the majority of antibiotics in the growth medium, possessing antagonistic activity concerning various kinds of pathogenic and opportunistic–pathogenic microflora are selected. Using these cultures we will receive a bacterial concentrate for enrichment of a substitute of the whole milk having probiotic effect.