

3. Куклин А.Д. Изучение контаминации микроорганизмами спермы жеребцов при замораживании: автореф. дис. канд. биол. наук. – Харьков, 1973. – 24 с.

4. Malmgren L., Olsson E.E., Engvall A., Albin A. (1998). Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility under field conditions. *Acta Vet. Scand.* Vol. 39 (2): 173-182.

5. Smole I., Thomann A., Frey J., Perreten V. (2010). Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 45 (4): 737-742.

6. Althouse G.C. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 43 (Suppl. 2): 374-378.

7. Национальная технология замораживания и использования спермы племенных быков производителей. – М., 2008. – 159 с.

8. Методические указания по ветеринарно-санитарному контролю качества замороженной спермы быков-производителей. – М., 2003. – 10 с.

9. Инструкция по организации и технологии работы станций и предприятий по искусственному осеменению сельскохозяйственных животных. – М., 1981. – 159 с.

10. ГОСТ 32198-2013 Средства воспроизводства. Сперма. Методы микробиологического анализа. – М.: Стандартинформ, 2014. – 30 с.

References

1. Radke H., Corbozl and Flukiger A. 9th European A.I. Vets Meeting, 1997. Neuchatel. Switzerland.

2. Ivanov V.S. Sovershenstvovanie sposoba asepticeskogo vzyatiya i obrabotki spermy khryakov: avtoref. dis. ... kand. vet. nauk. – Voronezh, 1982. – 24 s.

3. Kuklin A.D. Izuchenie kontaminatsii mikroorganizmami spermy zherebtsov pri zamorazhivanii: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. – Kharkov, 1973. – 24 s.

4. Malmgren L., Olsson E.E., Engvall A., Albin A. (1998). Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility under field conditions. *Acta Vet. Scand.* Vol. 39 (2): 173-182.

5. Smole I., Thomann A., Frey J., Perreten V. (2010). Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 45 (4): 737-742.

6. Althouse G.C. (2008). Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 43 (Suppl. 2): 374-378.

7. Natsionalnaya tekhnologiya zamorazhivaniya i ispolzovaniya spermy plemennykh bykov proizvoditeley. – М., 2008. – 159 s.

8. Metodicheskie ukazaniya po veterinarno-sanitarnomu kontrolyu kachestva zamorozhennoy spermy bykov-proizvoditeley. – М., 2003. – 10 s.

9. Instruksiya po organizatsii i tekhnologii raboty stantsiy i predpriyatij po iskustvennomu osemneniyu selskokhozyaystvennykh zhivotnykh. – М., 1981. – 159 s.

10. GOST 32198-2013 Sredstva vosproizvodstva. Sperma. Metody mikrobiologicheskogo analiza. – М.: Standartinform, 2014. – 30 s.



УДК 579.62

И.А. Функ, Е.Ф. Отт, Н.И. Владимиров
I.A. Funk, Ye.F. Ott, N.I. Vladimirov

ПОДБОР МИКРООРГАНИЗМОВ В СОСТАВ ПРОБИОТИКА ДЛЯ КОЗ

SELECTION OF MICROORGANISMS TO COMPOSE A PROBIOTIC FOR GOATS

Ключевые слова: козоводство, рациональное кормление, нормофлора, пробиотик, пропионовокислые бактерии, лактобактерии, активность кислотообразования, витамин B₁₂, антагонистическая активность, *Clostridium perfringens*.

Keywords: goat breeding, rational nutrition, normal flora, probiotic, propionic bacteria, lactobacilli, acid production activity, vitamin B₁₂, antagonistic activity, *Clostridium perfringens*.

Для обеспечения национальной безопасности страны в Российской Федерации принята стратегия повышения качества пищевых продуктов до 2030 г. Одним из главных условий интенсификации животноводства является применение концепции рационального кормления животных. За последнее десятилетие в практике кормления сельскохозяйственных животных в качестве альтернативы антибиотикам активно используются кормовые добавки с целью повышения переваримости и усвояемости корма, снижения затрат на производство продукции, увеличения продуктивности и сохранности животных. Среди кормовых добавок и премиксов выделяют группу стимуляторов роста, к которым относятся пробиотики. К пробиотическим культурам относят следующие микроорганизмы: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, дрожжи *Saccharomyces* и др. В работе представлены данные по отбору штаммов из сибирской коллекции микроорганизмов (СКМ) лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдел СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА в состав пробиотического препарата для коз. В качестве пробиотических микроорганизмов для препарата были отобраны 3 штамма пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium freudenreichii* spp, штаммы X₃, 149, 11₂) и 2 штамма растительной палочки (*Lactobacillus plantarum*, штаммы 28исх. И 8RA-3). Молочнокислые бактерии проверяли на активность кислотообразования и антагонистическую активность по отношению к тест-штаммам *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*; пропионовокислые бактерии – на образование витамина В₁₂ и антагонистическую активность по отношению к

Clostridium perfringens. В работе использовали общепринятые и стандартные методы микробиологического анализа.

To ensure the national security of the country, the Russian Federation adopted a strategy to improve the quality of food products until 2030. One of the main conditions for the development of animal husbandry is the application of the concept of rational animal nutrition. Over the past decade, feed supplements have been widely used as an alternative to antibiotics in the practice of farm animal nutrition in order to increase feed digestibility, reduce production costs and increase animal productivity and survival rate. Among the feed supplements and premixes, a group of growth promoters, which includes probiotics, is distinguished. Probiotic cultures include the following microorganisms: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Saccharomyces* yeast, etc. The paper presents the data on the selection of strains from the Siberian collection of microorganisms (SCM) of the Milk Microbiology and Dairy Product Lab, the Siberian Research Institute of Cheese Making. To compose a probiotic product, three strains propionic bacteria were selected: (*Propionibacterium freudenreichii* spp, strains X₃, 149, 11₂) and two strains of *Lactobacillus plantarum* – strain 28iskh. and 8RA-3. Lactic acid bacteria were tested for acid production activity and antagonistic activity with regarding to test strains of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*; the propionic bacteria – for the formation of vitamin B₁₂ and antagonistic activity against *Clostridium perfringens*. The conventional and standard microbiological analysis methods were used.

Функ Ирина Андреевна, аспирант, Алтайский государственный аграрный университет; м.н.с., лаб. микробиологии молока и молочных продуктов, отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: funk.irishka@mail.ru.

Отт Екатерина Федоровна, к.б.н., с.н.с. лаб. микробиологии молока и молочных продуктов, отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: Katya.ott.49@mail.ru.

Владимиров Николай Ильич, д.с.-х.н., проф., зав. каф. технологии производства и переработки продукции животноводства, Алтайский государственный аграрный университет. E-mail: vladimirov55@mail.ru.

Funk Irina Andreyevna, post-graduate student, Altai State Agricultural University; Senior Staff Scientist, Milk Microbiology and Dairy Product Lab., Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: funk.irishka@mail.ru.

Ott Yekaterina Fedorovna, Cand. Bio. Sci., Senior Staff Scientist, Milk Microbiology and Dairy Product Lab., Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: Katya.ott.49@mail.ru.

Vladimirov Nikolay Ilyich, Dr. Agr. Sci., Prof., Head, Chair of Animal Production and Processing Technologies, Altai State Agricultural University. E-mail: vladimirov55@mail.ru.

Введение

Козоводство является перспективной отраслью животноводства во многих странах, что обусловлено высокой стоимостью продукции и устойчивым спросом на неё как на мировом рынке, так и в России. Поэтому ведущим стратегическим направлением агропродовольственного сектора в современной экономике Российской Федерации является обеспечение национальной безопасности страны за счет употребления качественных продуктов питания. В связи с этим принята стра-

тегия повышения качества пищевых продуктов до 2030 г. [1].

Одним из главных условий интенсификации животноводства является применение концепции рационального кормления животных. Данная концепция рассматривает применение сбалансированных полноценных кормов, которые обеспечивают оптимальное использование генетического потенциала продуктивности животных и получение качественной продукции от них. Кормление животных должно быть организовано для обеспе-

чения условий эффективного использования кормов и регуляции микробиологических процессов пищеварения. Однако в современных условиях снижения сельскохозяйственного производства, недостатка кормов, их дороговизны, неудовлетворительного ветеринарно-санитарного состояния животноводческих помещений снижается естественная резистентность животных к различным заболеваниям. В результате развиваются дисбактериозы и иммунодефицитные состояния, растет процент заболеваемости, снижается продуктивность, повышается падеж [2].

Значительному улучшению лечебно-профилактической работы, состоянию здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных способствует применение антибиотиков. Однако при их широком применении в качестве лечебных препаратов происходит быстрое накопление резистентных микроорганизмов. К тому же антибиотики подавляют не только патогенные и условно-патогенные микроорганизмы желудочно-кишечного тракта, но и полезную микрофлору, а также угнетают иммунную систему организма.

За последнее десятилетие в практике кормления сельскохозяйственных животных в качестве альтернативы антибиотикам активно используются кормовые добавки с целью повышения переваримости и усвояемости корма, снижения затрат на производство продукции, увеличения продуктивности и сохранности животных. Среди кормовых добавок и премиксов выделяют группу стимуляторов роста, к которым относятся пробиотики [3, 4].

Полезную микрофлору, входящую в состав нормофлоры пищеварительного тракта животных, включают при создании пробиотических препаратов. Использование пробиотиков в питании животных способствует развитию полезной микрофлоры, которая заселяет желудочно-кишечный тракт и нормализует процессы пищеварения и всасывания питательных веществ.

Качественный состав микроорганизмов и их содержание в препарате обуславливают его пробиотические свойства. К пробиотическим культурам относят следующие микроорганизмы: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, дрожжи *Saccharomyces* и др., которые обеспечивают стабилизацию микрофлоры организма животного, восстанавливают ее нарушенный баланс и стимулируют иммунологическую функцию сли-

зистой оболочки пищеварительного тракта. Эффективность биопрепаратов усиливается при комбинировании нескольких видов микроорганизмов, принадлежащих к разным родам [5].

В настоящее время ассортимент пробиотических препаратов для животноводства достаточно широк. В то же время использование их в козоводстве остается малоизученным. Поэтому создание новых пробиотических препаратов для коз является перспективной задачей на сегодняшний момент.

Цель работы – подбор микроорганизмов в состав пробиотического препарата для коз.

Для реализации данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) выбрать штаммы из сибирской коллекции микроорганизмов отдел СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА по технологически ценным свойствам в состав пробиотического препарата для коз;
- 2) оценить активность кислотообразования *Lactobacillus plantarum* и продуцирование витамина B₁₂ *Propionibacterium freudenreichii* spp;
- 3) изучить антагонистическую активность отобранных штаммов по отношению к тест-штаммам *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*.

Материалы и методы

При проведении работы в качестве объектов исследования выступали пробиотические штаммы пропионовокислых бактерий и лактобактерий рода *Lactobacillus plantarum* из сибирской коллекции микроорганизмов (отдел СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА).

Для определения показателей технологически ценных свойств исследуемых объектов использовали общепринятые и стандартные методы микробиологического анализа: активная кислотность – потенциметрически по ГОСТ Р 53359-2009, антагонистическая активность – диффузионным методом по ТУ 9229-026-04610209-94, витамин B₁₂ – диффузионным методом с помощью тест-организма мутанта *Escherichia coli* 113-3 DSM 1900 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГБНУ «ГосНИИгенетика») [6].

Результаты и их обсуждения

Известно, что комбинированные закваски, входящие в состав пробиотиков, обладают более высокой биохимической активностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам среды по сравнению с заквасками, приготовленными на

монокультурах. Таким образом, наиболее оптимальным вариантом при производстве пробиотического препарата для коз будет создание поливидовой заквасочной композиции с использованием *Lactobacillus plantarum* и пропионовокислых бактерий (ПКБ).

В качестве пробиотических культур для препарата были выбраны 3 штамма пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium freudenreichii* spp, штаммы X₃, 149, 11) и 2 штамма растительной палочки (*Lactobacillus plantarum*, штаммы 28исх и 8RA-3). Культуры были взяты из сибирской коллекции микроорганизмов (СКМ) лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов (отдел СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА).

Пропионовокислые бактерии в состав пробиотического препарата были отобраны по ранее изученным технологически ценным свойствам.

Одним из ключевых положительных свойств пропионовокислых бактерий является продуцирование витамина В₁₂. Так как витамин В₁₂ выполняет важные функции в нормальном функционировании организма человека и животных, то основной задачей в ходе работы было определение содержания витамина В₁₂, продуцируемого ПКБ [7].

Определение витамина проводили диффузионным методом с помощью тест-организма мутанта *Escherichia coli* 113-3 DSM 1900 по методике, описанной в практикуме по микробиологии МГУ под редакцией Н.С. Егорова.

Результаты эксперимента показали, что многоштаммовая культура пропионовокислых бактерий продуцирует 1,5 мкг/мл витамина В₁₂.

Еще одним, набирающим в настоящее время популярность, пробиотическим штаммом является *Lactobacillus plantarum* (стрептобактерии). Этот вид чрезвычайно пластичен и достаточно легко приспосабливается к различным условиям обитания. Многие штаммы *Lactobacillus plantarum* продуцируют специфические антибиотические вещества различного спектра действия.

Кислотообразующая активность – важное свойство микроорганизмов. Кроме того, высокое кислотообразование является одним из наиболее распространенных механизмов проявления антагонистической активности многих микроорганизмов. В связи с этим важным критерием отбора *L. plantarum* для включения в состав пробиотического препарата явилась интенсивность кислотообразования [8].

На активность кислотообразования проверяли 12 штаммов *L. plantarum* из сибирской коллекции микроорганизмов лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдел СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА.

Результаты эксперимента показали, что наилучшим кислотообразованием обладали штаммы СКМ-651 (28исх) и СКМ-646 (8RA-3), предельная кислотность которых была на уровне 3,49-3,32 ед. рН.

В почве, сточных водах, пыли и желудочно-кишечном тракте домашних животных очень часто встречаются грамположительные, неподвижные, не имеющие жгутиков, спорообразующие строго анаэробные бактерии *Clostridium perfringens*. Зараженные этими бактериями продукты переработки животноводства могут вызывать газовую гангрену и токсикоинфекции человека. Поэтому одним из критериев при отборе пробиотических штаммов как ПКБ, так и *L. plantarum* в состав пробиотического препарата было определение антагонистической активности по отношению к *Cl. perfringens*. Работу по определению антагонистической активности в отношении *Cl. perfringens* проводили в Алтайском краевом ветеринарном центре по предупреждению и диагностике болезней животных.

Результаты эксперимента показали, что ассоциация ПКБ полностью подавляет рост *Cl. Perfringens* ATCC 13124, а *L. plantarum* подавляет сотни тысяч клеток *Cl. perfringens*, что обосновывает целесообразность введения данных микроорганизмов в состав пробиотического препарата.

Антагонистическую активность отобранных штаммов *L. plantarum* к тест-культурам *E.coli* определяли с помощью диффузионного метода перпендикулярных штрихов на твердой питательной среде (рис.).

В результате эксперимента было обнаружено, что у штаммов СКМ-651, СКМ-646 выявлена прямая зависимость между кислотообразующей активностью и зоной ингибирования тест-культур (чем ниже рН, тем сильнее подавление роста тест-культуры). Результаты анализа определения антагонистической активности отобранных штаммов *L. plantarum* к тест-культурам *E.coli* представлены в таблице.

Данные по активности кислотообразования и антагонистической активности обуславливают целесообразность включения *L. plantarum* в состав пробиотического препарата для коз.

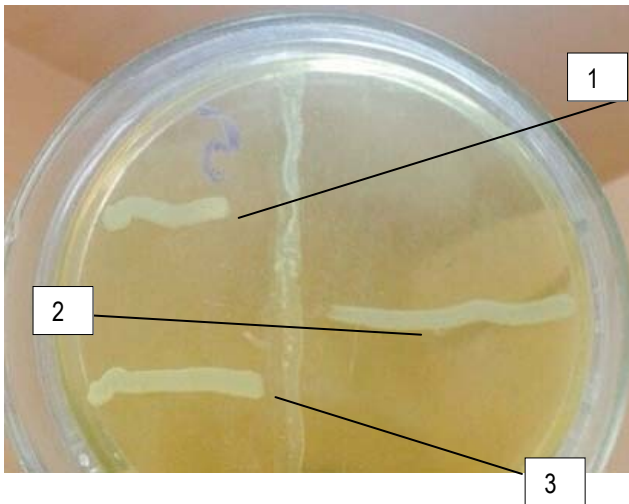


Рис. Проявление антагонистической активности *Lactobacillus plantarum* по отношению к *Escherichia coli*: 1 – зона ингибирования; 2 – тест-культура (*E. Coli*); 3 – антагонист (*L. plantarum*)

Таблица

Корреляция между кислотообразующей активностью и зоной ингибирования тест-культур

Индекс штамма	Активная кислотность (2 сут.), ед. $\mu\text{pH} \pm \Delta\text{pH}$	Зона ингибирования, см
СКМ-646 (8 РА-3)	$3,44 \pm 0,03$	0,2-0,8
СКМ-651 (28 исх)	$3,48 \pm 0,02$	0,5-0,9

Заключение

В ходе работы по физико-химическим и технологически ценным свойствам (активность кислотообразования, антагонистическая активность) в состав пробиотического препарата для коз были отобраны 3 штамма пропионовокислых бактерий (*Propionibacterium freudenreichii*, штаммы X₃, 149, 11) и 2 штамма лактобактерий (*Lactobacillus plantarum*, штаммы 28исх. и 8РА-3).

Библиографический список

1. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года. – Утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 29 июня 2016 г. № 1364-р.
 2. Бондаренко В.М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журнал микробиология. – 2004. – № 1. – С. 84-92.

3. Рядчиков В. Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных: учебное пособие. – СПб.: Лань, 2015. – 652 с.

4. Use of probiotics in the prevention of atopic dermatitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004. Vol. 4 (4): 270-275.

5. Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А. Создание пробиотиков широкого спектра действия // Тезисы докладов на международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития». – М., 2010. – С. 471.

6. Практикум по микробиологии: учебное пособие / под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 307 с.

7. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии. – М.: МГУ, 1995. – 288 с.

8. Pujol P., Huguet J., Drobnic F., Banquells M., et al. (2000). The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. *Sport. Med. Training Rehab.* Vol. 9 (3): 209-223.

References

1. Strategiya povysheniya kachestva pishchevoy produktcii v Rossiyskoy Federatsii do 2030 goda. – Utv. rasporyazheniem Pravitelstva Rossiyskoy Federatsii ot 29 iyunya 2016 g. No. 1364-r.
 2. Bondarenko, V.M. Disbiozy i preparaty s probioticheskoy funktsiey // *Mikrobiologiya*. – 2004. – No. 1. – S. 84-92.
 3. Ryadchikov V.G. Osnovy pitaniya i kormleniya selskokhozyaystvennykh zhivotnykh: uchebnoe posobie. – SPb.: Lan, 2015. – 652 s.
 4. Use of probiotics in the prevention of atopic dermatitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004. Vol. 4 (4): 270-275.
 5. GavriloVA, N.N. Sozdanie probiotikov shirokogo spektra deystviya / N.N. GavriloVA, I.A. RatnikoVA // *Tezisy dokladov na mezhdunarodnom kongresse «Biotekhnologiya – sostoyanie i perspektivy razvitiya»*. – M., 2010. – S. 471.
 6. Praktikum po mikrobiologii. Pod red. N.S. Yegorova. Uchebnoe posobie. – M.: Izd-vo Mosk. un-ta, 1976. – 307 s.
 7. Vorobeva, L.I. Propionovokislye bakterii. – M.: MGU, 1995. – 288 s.
 8. Pujol P., Huguet J., Drobnic F., Banquells M., et al. (2000). The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. *Sport. Med. Training Rehab.* Vol. 9 (3): 209-223.

