

6. Smolentsev S.Yu. Vliyanie probiotika «Sporobakterin» na biokhimicheskiy status porosyat / S.Yu. Smolentsev, A.L. Rozhentsov // Vestnik Mariyskogo gosudarstvennogo universiteta. – 2016. – Т. 2, No. 4. – С. 44-48.

7. Khaziakhmetov F.S. Produktivnye pokazateli i morfofiziologicheskoe sostoyanie porosyat-otemyshy pri ispolzovanii probiotika «Vetom» i raznykh doz probiotika «Vitafort» / F.S. Khaziakhmetov, A.F. Khabirov // Vestnik Kurganskoy GSKhA. – 2017. – No. 1. – С. 61-64.

8. Prikaz Ministerstva zdравookhraneniya SSSR N 755 ot 12.08.1977 “O merakh po dalneyshemu sovershenstvovaniyu organizatsionnykh form raboty s ispolzovaniem eksperimentalnykh zhivotnykh”.

9. Evropeyskaya konventsiya o zashchite pozvonochnykh zhivotnykh, ispolzuemykh dlya eksperimentov ili v inykh nauchnykh tselyakh. – Strasburg. – 18.03.1986.

10. GOST R 57879-2017 Zhivotnye plemennye selskokhozyaystvennyye. Metody opredeleniya parametrov produktivnosti sviney.



УДК 636.084.1: 087.8

Т.Н. Орлова, Е.Ф. Отт  
T.N. Orlova, Ye.F. Ott

## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В РАЦИОНАХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА ВИТАМИНА В<sub>12</sub>

### THE POSSIBILITY OF USING PROPIONIC BACTERIA IN FARM ANIMAL AND POULTRY DIETS AS A SOURCE OF VITAMIN B<sub>12</sub>

**Ключевые слова:** пробиотики, пробиотические препараты, пропионовокислые бактерии, функции пропионовокислых бактерий, витамин В<sub>12</sub>, определение концентрации витамина В<sub>12</sub>, дефицит витамина В<sub>12</sub>, микрофлора, антагонистическая активность, животноводство, птицеводство.

Пробиотики разделяют на 3 функциональные категории: антимикробные, иммуномоделирующие и метаболические. Все эти качества сочетают в себе пропионовокислые бактерии, что позволяет отнести их к одним из самых полезных микроорганизмов. Основными представителями классических пропионовокислых бактерий являются виды *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* и *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Одним из главных свойств пропионовокислых бактерий является их способность активно синтезировать витамин В<sub>12</sub>. Данный витамин участвует во многих процессах, протекающих в организме. Дефицит витамина В<sub>12</sub> в рационах сельскохозяйственных животных и птиц приводит к ухудшению их физиологического состояния и снижению продуктивности. Использование пропионовокислых бактерий в качестве дополнительного обогащения кормов животных и птиц продуктами витамином В<sub>12</sub> является актуальным направлением. Сотрудниками лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА была проведена работа по исследованию штаммов пропионовокислых бактерий видов *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* и *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* на активность синтеза витамина В<sub>12</sub>. Штаммы пропионово-

кислых бактерий были взяты из Сибирской коллекции микроорганизмов (СКМ) лаборатории микробиологии отдела СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА. Анализ полученных данных показал, что в 1 см<sup>3</sup> культуральной жидкости пропионовокислых бактерий содержится 1 мкг витамина В<sub>12</sub>. Многоштаммовая культура пропионовокислых бактерий была исследована на антагонистическую активность по отношению к таким условно-патогенным микроорганизмам, как *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*.

**Keywords:** probiotics, probiotic products, propionic bacteria, functions of propionic bacteria, vitamin B<sub>12</sub>, determination of vitamin B<sub>12</sub> concentration, vitamin B<sub>12</sub> deficiency, microflora, antagonistic activity, animal husbandry, poultry husbandry.

Probiotics are divided into three functional categories: antimicrobial, immunomodulatory and metabolic. All these qualities combine propionic bacteria and this makes them one of the most useful microorganisms. The main representatives of the classic propionic bacteria are the species of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. One of the main properties of propionic bacteria is their ability to actively synthesize vitamin B<sub>12</sub>. This vitamin is involved in many processes occurring in the organism. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency in the diets of farm animals and poultry leads to the deterioration of their physiological state and reduced productivity. The use of propionic bacteria as an additional enrichment of animal and poultry feeds with vitamin B<sub>12</sub> is an important direction. The

staff of the Milk and Dairy Product Microbiology Laboratory at the Siberian Research Institute of Cheese Making of the Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies carried out the study of propionic bacteria strains of the species *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* on the activity of vitamin B<sub>12</sub> synthesis. The strains of propionic bacteria were taken from the Siberian

Collection of Microorganisms (SCM) of the Milk and Dairy Product Microbiology Laboratory. The analysis of the data showed that 1 cm<sup>3</sup> of the culture liquid of propionic bacteria contains 1 µg of vitamin B<sub>12</sub>. The multi-strain culture of propionic bacteria was investigated for antagonistic activity against opportunistic microorganisms as *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*.

**Орлова Татьяна Николаевна**, аспирант, каф. частной зоотехнии, Алтайский государственный аграрный университет; н.с. лаб. микробиологии молока и молочных продуктов, отдел СибНИИС, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: orlova\_tn\_92@mail.ru.

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

**Orlova Tatyana Nikolayevna**, post-graduate student, Altai State Agricultural University; Staff Scientist, Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: orlova\_tn\_92@mail.ru.

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

### Введение

Пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium*) впервые были описаны в конце XIX в. Фройденрайхом (E. Von Freudenreich) и Орла-Енсенем (Sigurd Orla-Jensen) во время изучения пропионовокислого брожения в сыре Эмменталь.

Среди пропионовокислых бактерий (ПКБ) выделяют молочные (классические) и кожные виды. Основными представителями классических пропионовокислых бактерий являются виды *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* и *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Кожные виды пропионовокислых бактерий (*P. acnes*, *P. avidum* и др.) относятся к патогенной микрофлоре и являются возбудителями гнойных воспалений. В статье будем говорить о классических видах *Propionibacterium* [1].

Пропионовокислые бактерии, по праву, можно отнести к наиболее полезным микроорганизмам из анаэробов. Если пробиотики разделяют на 3 функциональные категории: антимикробные, иммуномоделирующие и метаболические, то все эти качества можно отнести к пропионовокислым бактериям [2, 3].

Одним из самых важных свойств ПКБ является их способность к активному синтезу витамина B<sub>12</sub>. Этот витамин обладает высокой биологической активностью и выполняет ряд жизненно важных функций: участвует в клеточном делении, без него невозможен синтез тканей животного организма; необходим для нормального кроветворения и созревания эритроцитов; обеспечивает вступление каротинов в обмен веществ и их превращение в активный витамин А; активизирует запасы железа в организме; участвует в обмене белков, жи-

ров и углеводов; участвует в строительстве защитного миелинового слоя нервов, а также в передаче нервных импульсов; оказывает благоприятное влияние на функцию печени и нервной системы [4].

В тканях животных витамин B<sub>12</sub> не образуется, он синтезируется микрофлорой кишечника, откуда поступает в органы, накапливаясь в наибольших количествах в почках, печени и стенке кишечника. Синтезом в кишечнике потребность организма в витамине B<sub>12</sub> полностью не обеспечивается, дополнительные количества должны поступать с продуктами животного происхождения. Витамин B<sub>12</sub> называют фактором «животного белка». Добавление его к растительным кормам повышает их усвоение и способствует значительному увеличению продуктивности животных и птиц [5].

Признаками нехватки витамина B<sub>12</sub> у животных является нарушение обмена веществ, а также дестабилизация функционирования эндокринных и кроветворных органов. Дефицит витамина B<sub>12</sub> чаще всего наблюдается у свиней и птиц. Жвачные животные менее подвержены данному заболеванию, так как у них в рубце интенсивно протекают биохимические процессы, связанные с жизнедеятельностью микроорганизмов, при этом синтезируется ряд витаминов группы В, в том числе и витамин B<sub>12</sub> [6, 7].

Витамин B<sub>12</sub> содержится в разных количествах в лечебных препаратах, получаемых из печени животных. В качестве источника для получения витамина B<sub>12</sub> путём микробиологического синтеза можно использовать пропионовокислые бактерии [1].

Многочисленные полезные свойства пропионовокислых бактерий, их способность к активному синтезу витамина В<sub>12</sub> и полное отсутствие у них токсичности позволили рекомендовать их в качестве лечебно-профилактических ветеринарных препаратов и кормовых добавок [2].

В 80-х годах прошлого столетия в качестве дополнительного обогащения кормов животных и птиц пропионовокислыми бактериями и продуктами их метаболизма применяли препарат ПАБК, представляющий собой бульонную культуру *P. shermanii* и *Lactobacillus acidophilus*, или препарат «Пропиовит», который был изготовлен на основе клеток *P. asnes*, выделенных из рубца коровы [1].

В настоящее время, несмотря на достаточно широкий ассортимент, в составе пробиотических препаратов для животноводства и птицеводства не так часто можно встретить пропионовокислые бактерии. Примерами таких препаратов могут служить «Велес» (в составе *Lb. plantarum* и *P. freudenreichii*) и «Витацелл» (в составе *Lb. acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *P. shermanii*). Одной из главных причин того, что ПКБ, обладающие рядом уникальных свойств, редко включают в состав лечебно-профилактических ветеринарных препаратов, являются особые условия, необходимые для наращивания биомассы пропионовокислых бактерий и отсутствие специалистов, занимающихся изучением данных микроорганизмов.

**Цель** работы – изучить многоштаммовую культуру пропионовокислых бактерий на способность продуцировать витамин В<sub>12</sub> и проявлять антагонистическую активность по отношению к условно-патогенным микроорганизмам.

#### Материалы и методы исследования

Исследования проводились в лаборатории микробиологии отдела СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА в 2019 г. Объектом исследований служили штаммы пропионовокислых бактерий видов *P. freudenreichii subsp. freudenreichii* и *P. freudenreichii subsp. shermanii* из Сибирской коллекции микроорганизмов (СКМ) лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА.

Культивирование многоштаммовой культуры ПКБ проходило на жидкой лактатной среде при температуре 30°C в течение 72 ч. Определение концентрации витамина В<sub>12</sub>, продуцируемого штаммами пропионовокислых бактерий, проводи-

лось микробиологическим методом с использованием тест-культуры *Escherichia coli* 113-3 DSM 1900 (штамм был взят из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика», г. Москва) по методике, прописанной биологическим факультетом кафедры микробиологии Московского государственного университета. Для определения достоверности результата для анализа было взято 3 пробы многоштаммовой культуры пропионовокислых бактерий [8].

Анализ на антагонистическую активность ПКБ по отношению к таким условно-патогенным микроорганизмам, как *E. coli* и *Cl. perfringens* проводили методом «желобка» на чашках Петри с агаризованной средой. В «желобок» заливали культуру ПКБ и затем штрихами подвели разведения тест-культуры, которая предварительно наращивалась на специализированной жидкой питательной среде. Максимальная концентрация тест-культуры, по отношению к которой определяли антагонистическую активность ПКБ, составила 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>, так как более высокая концентрацию клеток 10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и выше возможна только при получении бактериальных концентратов. По степени роста тест-культуры определяли антагонистическую активность пропионовокислых бактерий.

#### Результаты исследования и обсуждения

Данные, полученные в ходе проведения исследования на активность синтеза витамина В<sub>12</sub>, показали, что в 1 см<sup>3</sup> культуральной жидкости пропионовокислых бактерий содержится 1 мкг витамина В<sub>12</sub>. Для сравнения, рекомендуемая суточная доза витамина В<sub>12</sub> на 1 кг готового корма составляет для молодняка цыплят 10-20 мкг, бройлеров на откорме и для кур-несушек – 15-25, свиней на откорме – 10-20, свиноматок – 15-30 мкг.

Анализ на антагонистическую активность показал, что многоштаммовая культура ПКБ обладает подавляющим действием в отношении условно-патогенных микроорганизмов (табл.).

Результаты исследования по изучению пробиотических свойств многоштаммовой культуры ПКБ из коллекции СКМ позволяют использовать в дальнейшем данную культуру при разработке пробиотических препаратов для животноводства и птицеводства в лечебно-профилактических целях.

**Антагонистическая активность штаммов пропионовокислых бактерий по отношению к условно-патогенным микроорганизмам**

Тест-культура условно-патогенных микроорганизмов	Количественное содержание тест-культуры, КОЕ/см <sup>3</sup>	Степень выраженности антагонизма ПКБ по отношению к тест-культуре
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124 (из коллекции испытательной лаборатории КГБУ «АКВЦ»)	10 <sup>4</sup>	Полное подавление роста
	10 <sup>5</sup>	Полное подавление роста
	10 <sup>6</sup>	Полное подавление роста
	10 <sup>7</sup>	Полное подавление роста
	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	Полное подавление роста
<i>Escherichia coli</i> spp. (из коллекции СКМ)	10 <sup>4</sup>	Частичное подавление роста
	10 <sup>5</sup>	Частичное подавление роста
	10 <sup>6</sup>	Частичное подавление роста
	10 <sup>7</sup>	Частичное подавление роста
	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	Частичное подавление роста

**Библиографический список**

1. Воробьева, Л. И. Пропионовокислые бактерии / Л. И. Воробьева. – Москва: Изд-во МГУ, 1995. – 288 с. – Текст: непосредственный.
2. Рожкова, Е. П. Классические пропионовокислые бактерии как пробиотики: учебное пособие / Е. П. Рожкова. – Москва: Изд-во биологического факультета МГУ, 2018. – 44 с. – Текст: непосредственный.
3. Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., et al. (1994). Growth stimulator for bifidobacteria produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria. *J. Dairy Sci.* 77 (2): 393-404.
4. Piwowarek, K., Lipinska, E., Hac-Szymanczuk, E., et al. (2018). *Propionibacterium* spp. – source of propionic acid, vitamin B12 and other metabolites important for the industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2): 515-538.
5. Рядчиков, В. Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных: учебник / В. Г. Рядчиков. – Краснодар: КГАУ, 2014. – 616 с. – Текст: непосредственный.
6. Cousin, F.J., Foligne, B., Deutsch, S.-M., et al. (2012). Assessment of the probiotic potential of a dairy product fermented by *Propionibacterium freudenreichii* in piglets. *J. Agric. Food. Chem.* 60: 7917-7927.
7. Argañaraz-Martínez E., Babot J.D., Apella M.C., et al. (2013). Physiological and functional characteristics of *Propionibacterium* strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic. *Anaerobe.* 23: 27-37.
8. Егорова, Н. С. Практикум по микробиологии: учебное пособие / Н. С. Егорова. – Москва: Изд-во МГУ, 1976. – 307 с. – Текст: непосредственный.

**References**

1. Vorobeva L.I. Propionovokislye bakterii. – Moskva: Izd-vo MGU, 1995. – 288 s.
2. Rozhkova E.P. Klassicheskie propionovokislye bakterii kak probiotiki: uchebnoe posobie. – Moskva: Izd. Biologicheskij fakultet MGU, 2018. – 44 s.
3. Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., et al. (1994). Growth stimulator for bifidobacteria produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria. *J. Dairy Sci.* 77 (2): 393-404.
4. Piwowarek, K., Lipinska, E., Hac-Szymanczuk, E., et al. (2018). *Propionibacterium* spp. – source of propionic acid, vitamin B12 and other metabolites important for the industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2): 515-538.
5. Ryadchikov, V.G. Osnovy pitaniya i kormleniya selskokhozyaystvennykh zhivotnykh: uchebnik. – Krasnodar: KGAU, 2014. – 616 s.
6. Cousin, F.J., Foligne, B., Deutsch, S.-M., et al. (2012). Assessment of the probiotic potential of a dairy product fermented by *Propionibacterium freudenreichii* in piglets. *J. Agric. Food. Chem.* 60: 7917-7927.
7. Argañaraz-Martínez E., Babot J.D., Apella M.C., et al. (2013). Physiological and functional characteristics of *Propionibacterium* strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic. *Anaerobe.* 23: 27-37.
8. Egorova N.S. Praktikum po mikrobiologii: uchebnoe posobie. – Moskva: Izd-vo MGU, 1976. – 307 s.