

Розділ 6

ЕПІЗООТОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ, МІКОЛОГІЯ, ІМУНОЛОГІЯ

УДК 636.52/58.087.8:612.1

КОНСЕРВИРОВАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *BAC. SUBTILIS* ШТАММ *VI-12* КОНТАКТНО-СОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ

**Бибен И.А., к. вет. н., доцент, Захарский В.В., к. вет. н., доцент, Сосницкая А.А.,
студентка магистратуры ФВМ e-mail: bibenvet@ukr.net**
*Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепр,
Украина*

Аннотация. Представлены экспериментальные данные по консервированию контактно-сорбционным методом пробиотической культуры *Bac. subtilis* штамм *VI-12* в гранулированном виде.

Изучены исходные биологические характеристики пробиотической культуры *Bac. subtilis* штамм *VI-12* и показана полная биобезопасность бацилл по культуральным и биологическим свойствам, а также соответствие морфо-тинкториальных, культуральных, биохимических характеристик исследуемой культуры ее видовым параметрам

Разработаны и экспериментально обоснованы технологические параметры концентрирования бациллярной биомассы при производстве гранулированной формы биопрепарата и контактно-сорбционного метода консервирования с использованием различных сорбентов (разбавителей).

Установили, что высушенная контактно-сорбционным методом и гранулированная сухая бациллярная масса пробиотической культуры *Bac. subtilis* штамм *VI-12* является физиологически полноценным биопрепаратом, обладает удовлетворительными технологическими физико-химическими параметрами гранул и высокой концентрацией вегетоспособных сенных бацилл с активной споруляцией. Хранение консервированного биоматериала в форме гранул в течение 6 месяцев при 4-6 °С не оказывает существенного негативного влияния на биологическое качество пробиотической культуры.

Биопрепарат прошел производственные испытания на цыплятах и поросятах первых двух месяцев жизни и зарекомендовал себя как биологически активный и физиологически полезный компонент заместительной терапии при профилактике желудочно-кишечных дисбиозов и энтеральных нарушений различной этиологии.

Актуальность проблемы. Fuller R. [1998] определил XXI век, как время «наступающей эпохи пробиотиков». Бурное развитие исследований по проблеме пробиотических препаратов, дает основание предполагать, что пробиотики вытеснят традиционно применяемые с профилактической целью небезопасные для организма антибиотики в гуманной и ветеринарной медицине. Применение пробиотиков является типичным примером заместительной терапии. Пробиотики и симбиотики вариабельны и различаются не только по форме и биологическим характеристикам, но и по виду включенных в них представителей индигенной микрофлоры [2, 4, 7-13].

Для макроорганизма чрезвычайно важен баланс между нормальной и условно-патогенной микрофлорой кишечника. Поэтому пробиотики используют для стимуляции неспецифической резистентности; профилактики и терапии расстройств пищеварения алиментарной этиологии; замены антибиотиков в кормах; восстановления нормальной микрофлоры после антибиотикотерапии; улучшения процессов пищеварения, стимуляции адаптогенеза, повышения оплаты корма [3, 5, 6, 7-13].

Учитывая, что пробиотики являются живыми микроорганизмами, исследователи столкнулись с проблемой сохранения биологически полезных свойств микробных культур продолжительное

время. Для консервации микроорганизмов традиционно используются лиофильное и распылительное высушивание, которые имеют технологические ограничения по устойчивости объектов к низким и высоким температурам. Поиск альтернативных методов, лишенных этих ограничений по терминальным значениям температур привел к созданию контактно-сорбционного метода консервирования нативных свойств микробионтов [1-5, 13].

Контактно-сорбционный метод обезвоживания применяется для консервирования термолабильных биоматериалов, которые неудовлетворительно переносят замораживание при лиофилизации, а также высокие температуры, используемые при конвективном методе высушивания. Также, данный метод приобретает методологические преимущества тогда, когда используемый сорбент (осушитель) выполняет в последующем и роль разбавителя [1, 3, 5].

Цель работы: изучить возможность применения лактозы, сахарозы и глюкозы, которые используются как разбавители при получении таблетированных форм биопрепаратов, как сорбентный элемент консервирования контактно-сорбционным методом пробиотической культуры *Bac. subtilis* штамм *BI-12* в гранулированном виде.

Материал и методы исследований. Морфо-тинкториальные свойства пробиотической культуры контролировали общепринятыми методами.

В качестве питательных сред использовали МПА, МПБ, модифицированную среду Гаузе № 2, МПА с добавлением 7 % NaCl, 5 % кровяной МПА для определения гемолитических свойств, яичный бульон для тестирования лецитиназной активности, казеиновый и крахмальный агары для определения ферментативных свойств. Посевы помещали в термостат при 37-38 °C на 18-24 ч, просматривали посевы, готовили мазки и окрашивали их по Граму, а характер колониального роста изучали в косопрходящем свете на среде Гаузе № 2.

Количество живых микробных клеток (ж.м.к.) определяли культуральным методом, посевом десятикратных разведений суспензии прокариот на селективный агар с последующим подсчетом выросших колоний и их перерасчетом в ж.м.к./см³. Предварительное определение количества микробных клеток (м.к.) бактерий без учета их вегетоспособности определяли с помощью бактериального стандарта мутности или фотоэлектрориметрированием.

Биологическую концентрацию термоустойчивых клеток (БК) определяли методом последовательных десятикратных разведений испытуемой микробной суспензии в физрастворе с последующим нагреванием до 94,0±0,5 °C в течение 13±1 мин и высевом микробной суспензии на МПА. После 24±4 ч инкубации при t° 37±1 °C проводили подсчет выросших колоний.

Определение количества зрелых спор проводили методом микроскопии мазков исследуемой культуры и подсчетом бацилл, окрашенных по Циль-Нильсену в розовый цвет. Спорообразование (%) изучаемых бацилл рассчитывали как отношение БК к БК_т.

Влажность гранулированного пробиотического препарата определяли по разности масс проб до и после высушивания при t° 105±2 °C.

РН сред и растворов определяли потенциометрическим методом.

Сыпучесть порошков определяли в пробе весом 50±0,5 г. которую засыпали в воронку. С открытием конуса и началом высыпания регистрировали время истечения всей навески. Расчет проводили по формуле $V = m/t_s$, где V – сыпучесть порошка (г/мин); m – навеска порошка (г); t_s – время истечения порошка через воронку (мин).

Относительное уплотнение биоматериала рассчитывали по формуле $E = 1(P_m/P_o)$, где E – относительное уплотнение биоматериала (ед); P_m – объемная плотность (кг/см³); P_o – насыпная плотность (кг/см³). Из формулы относительного уплотнения вычисляли насыпную плотность.

Полученные количественные показатели обработаны на РС с помощью пакета статистических программ «Statistica» и программы Excel 2000, для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Стьюдента-Фишера. Полученные результаты считались достоверными при уровне значимости $p \geq 0,05$.

Результаты исследований. Контроль морфологической чистоты и соответствия видовым характеристикам пробиотической культуры проводили при светлупольной микроскопии в иммерсионной системе препаратов-мазков окрашенных по Граму. Обнаружили грампозитивные стрептобациллы и одиночные клетки размером 2,8-3,2×0,6-0,8 мкм, с центральным и парацентральным расположением светопреломляющих эндоспор.

Структуру колоний *Bac. subtilis* регистрировали на селективной плотной среде Гаузе №2 в косопрходящем свете и при этом обнаружили три варианта структурирования колоний: - круглые, крупные, с ровными краями, выпуклые, куполообразные, матовые, зернистые, шероховатые колонии, а также зернистые колонии с выступающим центром; - амёбовидной формы с волнистыми краями, морщинистые, плоские, шероховатые колонии; - круглые, выпуклые, куполообразные,

Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини

шероховатые колонии с волнистыми краями. Все три морфологических варианта колоний были светло-серого цвета и синтезировали пигмент от бежевого до розового оттенков.

Исследуемая культура сенных бацилл характеризовались подвижностью, способностью утилизировать глюкозу, ксилозу, маннит, сахарозу, мальтозу, гидролизовать эскулин и крахмал, не утилизировали лактозу и салицин, не образовывали газ при расщеплении глюкозы. Пробиотический штамм обладал способностью к росту на средах в присутствии 7 % NaCl и цитрата, восстанавливал нитраты, не продуцировал индол, сероводород и фермент уреазу, не утилизировал пропионат, гидролизировал крахмал и казеин, а также разжижал 10 % желатину. У штамма не выявлено патогенных свойств, о чем свидетельствует отсутствие гемолитической и лецитиназной активности.

Дополнительно апатогенность подтвердили в биопробе на белых мышах живой массой 18-20 г при заражении подкожно и внутрибрюшинно по 6 животных на каждую заражающую дозу суточной бульонной культурой в объеме 1,0 см³. В течение 14 суток наблюдения никаких болезненных изменений не обнаружили, что говорит о апатогенности пробиотической культуры.

Концентрирование микробной массы проводили по оригинальной авторской методике, для чего в сорбент (разбавитель) при постоянном перемешивании вводили концентрат пробиотической культуры из расчета содержания влаги не более (12±1 %), до образования пластической массы. Приготовленную смесь гранулировали через сито с диаметром отверстий 3 мм и равномерно распределяли по поддону слоем толщиной не более 10 мм. Биомассу выдерживали в течение 24 ч при t° 22±2 t°, затем пропускали через сито с диаметром отверстий 2 мм.

Обезвоживание бациллярной массы проводили по оригинальной авторской методике, для чего в сорбент (разбавитель) при постоянном перемешивании вводили концентрат пробиотической культуры из расчета содержания влаги не более (12±1 %), до образования пластической массы. Приготовленную смесь гранулировали через сито с диаметром отверстий 3 мм и равномерно распределяли по поддону слоем толщиной не более 10 мм. Биомассу выдерживали в течение 24 ч при t° 22±2 t°, затем пропускали через сито с диаметром отверстий 2 мм.

Грануляты пробиотической культуры, полученные на основе различных разбавителей (лактоза, сахароза, глюкоза), характеризовались близкими по значению физико-химическими показателями качества бациллярной биомассы, изложенными в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химические показатели гранул пробиотической культуры *Bac. subtilis* штамм BI-12

Сорбент (разбавитель)	Насыпная плотность, кг/м ³	Сыпучесть, кг/м ² с	Содержание частиц, диаметром ... мм, % (по биомассе)		
			≥ 0,4	0,3 – 0,4	0,1 – 0,3
Лактоза	613±46	66±13	4±2	29±4	54±14
Сахароза	542±44	71±14	6±2	53±11	32±4
Глюкоза	502±42	52±12	≤1	14±4	34±6

Как следует из табл. 1, грануляты пробиотической культуры имеют высокие показатели по насыпной плотности и сыпучести, а основная масс гранул (до 68 %) имеет размеры частиц от 0,1 до 0,3 мм. При этом концентрация бацилл в биомассе составляет 147×10⁹±38×10⁸ ж.м.к./см³, спорообразование составило – 66±7 %. Грануляты на основе лактозы обладали меньшей поглотительной способностью и были менее подвержены изменению относительной гигроскопичности во всем интервале относительной влажности окружающей среды.

Таким образом, грануляты пробиотической культуры сенных бацилл, полученные на основе концентрированной на установке распылительной сушки бациллярной биомассы и консервированные контактно-сорбционным методом, имеют удовлетворительные технологические свойства и незначительную гигроскопичность, что дает возможность использовать разработанный нами метод гранулирования культуры *Bac. subtilis* штамм BI-12 в технологии промышленного получения гранулированного пробиотика.

При морфо-тинкториальном, культуральном и биологическом контроле пробиотической культуры в составе гранул, сразу после технологического цикла контактно-сорбционным консервирования и через 6 месяцев хранения биоматериала при 4-6 °C установили, что физико-химические параметры гранул оставались в границах первоначальных значений, зарегистрированных сразу после их изготовления, а количество вегетоспособных бацилл снизилась на 7±0,4 %, по сравнению со стартовыми показателями. Морфо-тинкториальные и культуральные свойства не изменились за период наблюдения и полностью соответствовали видовым. Патогенных и посторонних форм микроорганизмов не обнаружено. Биопрепарат является физиологически

якістю та безпекою продуктом мікробного синтезу і успішно пройшли виробничі випробування.

Висновки

Суша біомаса пробіотичної культури *Vac. subtilis* штам ВІ-12 є фізіологічно цінним біопрепаратом, має задовільні технологічні фізико-хімічні параметри гранул і високу концентрацію вегетоспроможних сенних бацилл з активною споруляцією. Зберігання консервованого біоматеріалу в формі гранул протягом 6 місяців при 4-6 °С не має суттєвого впливу на біологічну якість пробіотичної культури.

Література

1. Аркадьєва З.А. Фактори, що впливають на життєспроможність і властивості мікроорганізмів при різних методах зберігання / З.А. Аркадьєва // Біологічні науки – 1993. – №4. – С. 93-104.
2. Бакуліна Л.Ф. Пробиотики на основі спороутворюючих мікроорганізмів роду *Bacillus* і їх використання в ветеринарії / Л.Ф. Бакуліна, І.В. Тимофєєв, Н.Г. Перминова // Біотехнологія – 2001. – №2. – С. 48-56.
3. Бєссарабов Е. Випробування мікродисперсної форми пробіотика «Лактобіфадол» курам / Е. Бєссарабов [Текст] // VI Міжнародний ветеринарний конгрес по птицеводству, 26-29 квітня 2010 р. – М. – С. 158-163.
4. Осипова І.Г. Спориві пробіотики / І.Г. Осипова, Н.А. Михайлова, І.Г. Сорочулова і др. [Текст] // Журн. мікробіол. – 2003. – № 3. – С. 113-119.
5. Топчий М.П. Використання препаратів з живих культур сенної палички при дисбактеріозах у телят: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Миск, 1997. – 21 с.
6. Тришина Н.В. Зв'язок між розвитком дисбактеріоза кишечника і станом антиендоксинного імунітету: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Москва, 2003. – 24 с.
7. Янковський Д.С. Мікробна екологія людини: сучасні можливості її підтримки і відновлення. – К.: Експерт ЛТД, 2005. – 362 с.
8. Bansal S. Probiotics in health and diseases / S. Bansal [Text] // J. Assoc. physicians. – 2001. – № 7. – P. 734-741.
9. Berg R.D. Probiotics, prebiotics, or conbiotics / R.D. Berg // Trends Microbio. – 1998. – Vol. 6. – P. 89-92.
10. Bengmark S. Colonic food: pre- and probiotics / S. Bengmark // Am. J. Gastroenterol. – 2000. – Vol. 95 (1). – P. 5-7.
11. Collins M.D. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut / M.D. Collins, G.R. Gibson [Text] // Am. J. Clin. Nutr. 1999 – Vol.69 (5). – P. 1052 – 1057.
12. Factorial correspondence analysis of fear-related behavior traits in Japanese quail / S. Mignon-Grasteau, O. Roussot, C. Delaby et al. // Behaviour Processes. – 61(1-2). – 2003. – P. 69-75.
13. Fuller R. Probiotics and prebiotics: microbial management for improved good health / R. Fuller, G.R. Gibson // Clin. Microbial. Infect. – 1998 – Vol. 4. – P. 477-480.

КОНСЕРВУВАННЯ ПРОБІОТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *VAC. SUBTILIS* ШТАМ ВІ-12 КОНТАКТНО-СОРБЦІОННИМ МЕТОДОМ

Бібєн І.А., к. вет. н., доцент, Захарський В.В., к. вет. н., доцент, Сосницька А.О., студентка магістратури ФВМ, e-mail: bibenvet@ukr.net

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро, Україна

Анотація. Представлені експериментальні дані щодо консервації контактної сорбційної методу пробіотичної культури *Vac. subtilis* штам ВІ-12 в гранульованому виді.

Вивчені вихідні біологічні характеристики пробіотичної культури *Vac. subtilis* штам ВІ-12 і показано її повну безпеку за культуральними і біологічними властивостями, а також відповідність пробіотичної культури видовим параметрам за морфо-тінкторіальними, культуральними і біохімічними характеристиками.

Розроблені та експериментально доведені технологічні параметри концентрації бацилярної біомаси при виробництві гранульованої форми біопрепарату та контактної сорбційної методу консервації з використанням різних сорбентів (розбавителів).

Встановили, що висушена контактної сорбційної методу і гранульована суша бацилярна маса пробіотичної культури *Vac. subtilis* штам ВІ-12 є фізіологічно цінним біопрепаратом, має добрі технологічні фізико-хімічні параметри гранул та високу концентрацію вегетоспроможних сенних бацилл з активною споруляцією. Зберігання консервованого біоматеріалу у формі гранул протягом 6 місяців при 4-6 °С не має суттєвого впливу на біологічну якість пробіотичної культури.

Біопрепарат пройшов виробничі випробування на курчатах та поросятах перших двох місяців життя і зарекомендував себе як біологічно активний і фізіологічно повноцінний компонент замісної терапії при профілактиці шлунково-кишкових дисбіозів та ентаральних порушень різноманітної етіології.

PRESERVATION OF BAC. SUBTILIS PROBIOTIC CULTURE OF BI-12 STRAIN BY CONTACT-SORPTION METHOD

Biben I., Ph.D., Zazharskij V., Ph.D., Sosnyts`ka A., master student of veterinary medicine faculty
[e-mail:bibenvet@ukr.net](mailto:bibenvet@ukr.net)

Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Summary. The experimental data on the preservation of Bac. subtilis probiotic culture of the strain BI-12 in granular form are represented by contact-sorption method.

The initial biological characteristics of the Bac. subtilis probiotic culture of the strain BI-12 was studied and the complete biosafety of the bacilles according to the cultural and biological properties was shown, as well as the accordance of morpho-tinctorial, cultural, biochemical characteristics of the studied culture to its specific parameters.

The studied culture of the hay bacterium was characterized by motility, ability to utilize glucose, xylose, mannitol, sucrose, maltose, to hydrolyze esculin and starch; lactose and salicin were not utilized; without gas forming during the cleavage of glucose. The probiotic strain had the ability to grow on the medias in the presence of 7% solution of NaCl and citrate, restored the nitrates, did not produce the indole, hydrogen sulphide and the urease enzyme, also did not utilize the propionate, hydrolyzed starch and casein, and also liquefied 10% solution of gelatin. The strain had not shown the pathogenic properties, as evidenced by the absence of the hemolytic and lecithinase activity.

The technological parameters of the concentration of bacillary biomass in the production of a granular form of the biopreparation and the contact-sorption method of the conservation using various sorbents (diluent) have been developed and experimentally substantiated.

Was established that the dried by the contact-sorption method and granulated bacillary mass of the Bac. subtilis probiotic culture of the strain BI-12 is a physiologically valuable biopreparation, which has satisfactory technological physicochemical parameters of granules and a high concentration of viable hay bacterium with active sporulation.

The concentration of the microbial biomass of the hay bacterium was previously conducted in a drying installation at the standard technological parameters provided for the bacillary biomaterial. The dehydration of the bacillary mass was conducted according to the original author's technique, for which a concentrate of probiotic culture was introduced into the sorbent (diluent) with constant mixing, assuming that the moisture content is no more than $12 \pm 1\%$, while the plastic mass will form.

The storage of biological material, which is preserved in the form of granules, for 6 months at $4-6^{\circ} \text{C}$ does not have a significant negative effect on the biological quality of the probiotic culture.

The biopreparation was passed the production tests on chickens and piglets of the first two months of life and was established itself as a biologically active and physiologically useful component of the replacement therapy in the prevention of gastrointestinal dysbiosis and enteral disorders of various etiologies.