

*tehnologii v prvoj zone prudovogo rybovodstva / T. G. Krylova [i dr.] // Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. – 2016. – № 1. – S. 60–67. 3. Pishchenko, E. V. Gematologiya presnovodnoj ryby: uchebnoe posobie / E. V. Pishchenko. – Novosibirsk: izd-vo NGAU, 2002. – 48 s. 4. Hematological and clinical chemistry changes induced by acute stress during handling and capture of catfish (*Ictalurus punctatus*) / G. Aguirre-Guzman, V. Carvajal-de-la-Fuente, M. Neri-Coronado, [et al] // Revista MVZ Cordoba. – 2016. – № 21. – P. 5345–5354. 5. Küçükgül, A. Acute stress response in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) of some stressing factors / A. Küçükgül, A. Şahan // Journal of Fisheries Sciences. – 2008. – № 2. – P. 623–631. Doi: 10.3153/jfscom.2008026. 6. Refaey, M. M. Transport Stress Changes Blood Biochemistry, Antioxidant Defense System, and Hepatic HSPs mRNA Expressions of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* / M. M. Refaey, D. Li // Frontiers in Physiology. – 2018. – № 9. – P. 1–11. Doi: 10.3389/fphys.2018.01628. 7. Sadoul, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes / B. Sadoul, B. Geffroy // Fish Biology. – 2019. – 94. – P. 540–555. Doi: 10.1111/jfb.13904. 8. The effect of transport on biochemical and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.) / R. Dobšikova, Z. Svobodova, J. Blahova [et al] // Czech Journal of Animal Science. – 2009. – № 54. – P. 510–518. 9. The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) / F. Fazio, V. Ferrantelli, G. Fortino [et al] // Italian Journal of Food Safety. – 2015. – № 4. – P. 4–6. Doi:10.4081/ijfs.2015.4174.*

Поступила в редакцию 03.11.2021.

DOI 10.52368/2078-0109-2021-57-4-82-86

УДК 57:579.64:636.084

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАКТУЛОЗЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

Явников Н.В. ORCID iD 0000-0002-6900-331X

ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина», пос. Майский, Белгородская область, Российская Федерация

Одним из способов коррекции дисбиозов является применение препаратов на основе пробиотических штаммов микроорганизмов, а также пребиотиков. Целью работы было повышение эффективности совместного культивирования лакто- и бифидобактерий для разработки новых пробиотических кормовых добавок. Для этого был отработан состав питательной среды с различным уровнем лактулозы и определено оптимальное соотношение пробиотических штаммов при их совместном культивировании. Для создания бактериального консорциума, по результатам предыдущих исследований, нами отобраны штаммы *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β и штамм *Lactobacillus plantarum* 8 β как наиболее активные пробиотические культуры. Бифидобактерии культивировали в среде Блаурока (pH 6,5 \pm 0,1) при температуре 38,0 \pm 0,5 $^{\circ}$ C. Лактобактерии растворяли в питательной среде MRS-1 (pH 6,5 \pm 0,1) и восстанавливали при температуре 37,0 \pm 0,5 $^{\circ}$ C в течение 24 часов. Затем проводили два последовательных пассажа на средах MRS-2 (pH 6,3 \pm 0,1) и MRS-4 (pH 6,3 \pm 0,1). Совместное культивирование лактобактерий и бифидобактерий проводили в казеиново-дрожжевой среде. Исследования показали, что добавление лактулозы в питательную среду в количестве 1,0% и 1,5% позитивно сказывается на культуральных показателях пробиотических культур. При совместном культивировании лактобактерий *L. plantarum* 8 β и бифидобактерий *B. adolescentis* 17-11 β наибольший биологический бактериальный консорциум проявляется при соотношении лакто-и бифидобактерий 1:2. В результате проведенных исследований установлено, что культивирование данных штаммов в условиях *in vitro*, с добавлением в качестве пребиотического компонента 1,5% лактулозы, позволяет получить наибольшие показатели роста и уровень накопления бактериальной массы. **Ключевые слова:** бифидобактерии, лактобактерии, концентрация, колониеобразующие единицы, температура, pH.

USE OF LACTULOSE FOR INCREASE IN THE EFFICIENCY OF PRODUCTION OF PROBIOTIC FEED ADDITIVES

Yavnikov N.V.

Belgorod State Agricultural University named after V. Gorin, Mayskiy village, Belgorod region, Russian Federation

One of the ways to correct dysbiosis is the use of preparations based on probiotic strains of microorganisms as well as prebiotics. The aim was to increase the effectiveness of joint cultivation of lacto and bifidobacteria for the development of new probiotic feed additives. For this purpose, the composition of a nutrient medium with different levels of lactulose was designed, and the optimal ratio of probiotic strains was determined for joint cultivation. To create a bacterial consortium, on the basis of previous investigation, the strain of *Bifidobacterium adolescentis* 17-11 β and the strain of *Lactobacillus plantarum* 8 β were selected as the most active probiotic cultures. Bifidobacteria were cultivated in the Blaurock medium (pH 6.5 \pm 0.1) at a temperature of 38.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C. Lactobacteria were dissolved in a nutrient medium MRS-1 (pH 6.5 \pm 0.1) having been recovered at a temperature of 37.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C for 24 hours. Then two successive passages followed, on the MRS-2 media (pH 6.3 \pm 0.1) and MRS-4 (pH 6.3 \pm 0.1). The joint cultivation of lactobacteria and bifidobacteria was performed in the casein-yeast medium. Studies have shown that the addition of lactulose to a nutrient in the amount of 1.0% and 1.5% has a positive effect on the cultural traits of probiotic cultures. In the joint cultivation of lactobacteria *L. plantarum* 8 β and bifidobacteria *B. adolescentis* 17-11 β , the largest biological bacterial consortium manifests at a ratio of lacto-bifidobacterium 1:2. As a result of the conducted research, it has been found that the

cultivation of these strains under conditions in vitro, with the addition of 1.5% lactulose as a prebiotic component, allows to obtain the highest rate of growth and the level of accumulation of bacterial mass. **Keywords:** *Lactulose, bifidobacteria, lactobacteria, concentration, colonization units, temperature, pH.*

Введение. Современный этап развития животноводства характерен преобладанием хозяйств промышленного типа, особенно в птицеводстве и свиноводстве. Что, в свою очередь, приводит к росту факторов, негативно влияющих на состав и активность аутофлоры животных. В результате снижения количества бифидобактерий и лактобацилл в организме животных нарушаются процессы пищеварения и течение многих основных биохимических процессов, вследствие чего ухудшается общее состояние организма и снижается его устойчивость к действию патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Главными причинами этого являются широкое применение кормовых антибиотиков, а также использование некачественных кормов [1-3].

Важность применения кормовых микробиологических препаратов для улучшения состояния здоровья сельскохозяйственных животных и птицы, повышения уровня их продуктивности не вызывает сомнений. Доказательством этого являются многочисленные исследования по изучению влияния кормовых пробиотиков и пребиотиков различного происхождения на организм сельскохозяйственных животных и птицы, изучение особенностей проявления их действия при использовании в условиях промышленного животноводства, а также влияния на качество получаемой продукции с целью обеспечения возрастающих требований потребителей [4, 5].

На сегодняшний день создано большое количество биологически активных добавок и лекарственных препаратов, основу которых составляют средства, разработанные на основе индигенной микрофлоры макроорганизма. С этой целью, как правило, используются разные штаммы бифидо- и лактобактерий, непатогенные штаммы кишечной палочки, энтерококков и бацилл. Одни из самых широко используемых микроорганизмов для изготовления биопрепаратов – лактобациллы и бифидобактерии [6-8].

В кормлении животных положительные эффекты от применения пребиотиков реализуются выборочной стимуляцией роста полезной микрофлоры, с одновременным негативным влиянием на патогенную, условно-патогенную микрофлору и их токсичные метаболиты [9]. Кормовой пребиотический эффект лактулозы доказан многочисленными исследованиями. Лактулоза, стимулируя рост нормальной микрофлоры кишечника, способствует поддержанию антиинфекционной защиты макроорганизма.

Целью работы было изучение влияния пребиотика лактулозы на основные показатели роста пробиотических лакто- и бифидобактерий для повышения эффективности производства пробиотических кормовых добавок.

Материалы и методы исследований. Экспериментальные исследования выполнялись в Испытательной лаборатории ФГБОУ ВО Белгородский ГАУ. Для создания бактериального консорциума, по результатам предыдущих исследований, нами отобраны штамм бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* № 17-11 β и штамм *Lactobacillus plantarum* № 8 β как наиболее активные пробиотические культуры [10]. Нашими исследованиями по сравнению различных сахаров (лактuloзы, инулина и фруктозы) наибольший пребиотический эффект выявлен у лактулозы.

Лиофилизат бифидобактерий растворяли в питательной среде Блаурока (рН 6,5±0,1) и культивировали при температуре 38,0±0,5°С в течение 96 часов, путем двух последовательных пересевов на питательную среду Блаурока, продолжительностью 48 часов каждый.

Лиофилизат лактобактерий растворяли в питательной среде MRS-1 (рН 6,5±0,1) и культивировали при температуре 37,0±0,5°С в течение 24 часов. Затем проводили два последовательных пассажа на средах MRS-2 (рН 6,3±0,1) и MRS-4 (рН 6,3±0,1).

Для совместного культивирования бифидобактерий и лактобацилл использовали питательную среду КДС (казеиново-дрожжевую). Культивирование проводили в течение 72 часов при температуре 37,0±0,5°С. Для определения оптимальной концентрации пребиотика при совместном культивировании лактобацилл и бифидобактерий использовали модифицированную среду КДС с добавлением различных концентраций лактулозы. Время культивирования – 72 часа при 37,0±0,5°С.

Концентрацию лакто- и бифидобактерий после культивирования определяли по количеству живых микробных клеток, выявленных методом серийных разведений в физиологическом растворе с последующим высевом культур на твердые питательные среды с подсчетом количества колониеобразующих единиц.

Морфологию бактерий определяли путем световой микроскопии мазков культур, окрашенных по Грамму.

Определение активности кислотообразования культур проводили титриметрическим методом с 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Характерным признаком роста и размножения лакто- и бифидобактерий является подкисление питательной среды своими метаболитами. Для коррекции рН среды культивирования применяли 10%

раствор аммиака (NH_3). Общее количество внесенной дозы раствора аммиака указывает на метаболическую активность культур, то есть чем большее количество данных веществ используется для стабилизации pH среды, тем активнее проходят метаболические процессы бактериальной культуры.

Результаты исследований. Результаты исследования количества живых бактериальных клеток и активность кислотообразования при совместном культивировании лактобактерий и бифидобактерий в соотношениях маточных культур в смеси лактобактерии: бифидобактерии – 1:1, 1:2, 2:1 приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Количество живых лактобактерий и бифидобактерий и активность кислотообразования (n=5)

№ пробы	Соотношение культур	<i>L. plantarum</i> 8 β	<i>B. adolescentis</i> 17-11 β	Активность кислотообразования, °Т
		КОЕ/см ³	КОЕ/см ³	
1	1:1	(4,02±0,13)×10 ⁹	10 ¹⁰ –10 ¹¹	223,0±12,6
2	1:2	(5,38±0,08) ×10 ^{9*}	10 ¹¹ –10 ¹²	283,0±12,0
3	2:1	(2,26±0,09) ×10 ⁹	10 ¹¹ –10 ¹²	267,4±8,4
4	контроль бифидобактерий	–	10 ¹⁰ -10 ¹¹	173,4±6,4
5	контроль лактобактерий	(3,78±0,08) ×10 ⁹	–	263,2±6,7

Примечание. Различия достоверны в сравнении контрольной монокультурой лактобактерий (p≤0,05).

При определении количества бифидобактерий общее количество живых клеток было на одном уровне с контролем в соотношении культур 1:1, а при соотношении 1:2 и 2:1 было выше контроля и составляло 10¹¹–10¹² в обоих вариантах. Количество лактобактерий было наибольшим при соотношении культур лактобактерий к бифидобактериям 1:2, при таком соотношении культур также выявлена наивысшая активность кислотообразования.

Об интенсивности роста бактерий в течение срока культивирования и его окончания свидетельствует количество добавленного 10,0% раствора NH_3 , который используется для коррекции pH среды до необходимого уровня. Визуальный осмотр образцов подтверждает рост и накопление биомассы. В наших экспериментах во всех пробах со временем наблюдалось формирование на дне флакона белого осадка различной интенсивности (таблица 2).

Таблица 2 – Количество добавленного 10,0% раствора NH_3 во время роста пробиотических культур, мл (n=6)

№ пробы	Соотношение культур	Рост пробиотических культур, часов		
		24	48	72
1	1:1	0,21	0,03	0,03
2	1:2	0,22	0,04	0,05
3	2:1	0,12	0,04	0,04
4	контроль бифидобактерий	0,21	0,05	0,04
5	контроль лактобактерий	0,12	0,02	0,04

Пробиотические бактерии подкисляют среду роста, метаболизируя компоненты субстрата, тем самым увеличивая количество биомассы. Для стабилизации pH среды использовали раствор NH_3 , таким образом, большее количество аммиака, внесенное в культуральную среду, свидетельствует о более высоких метаболических процессах в данной бактериальной культуре. Из данных таблицы 2 наивысшее количество потребления NH_3 , в эксперименте по сокультивированию бифидобактерий и лактобактерий, наблюдается в соотношении 1:2 и составляет 0,31 см³. При культивировании

пробиотических культур в соотношении 1:1 количество потребленной NH_3 равно $0,27 \text{ см}^3$, что меньше на 14,8%, а при соотношении культур микроорганизмов 2:1 этот показатель меньше на 55,0% по сравнению с соотношением бифидобактерий к лактобактериям 1:2. В контрольных пробах при культивировании только бифидобактерий количество потребленной NH_3 составляет $0,30 \text{ см}^3$, а в монокультуре лактобактерий – $0,18 \text{ см}^2$. Также следует отметить, что количество NH_3 постепенно увеличивается в течение культивирования пробиотических культур в зависимости от их соотношения.

Результаты исследований, приведенные в таблицах 1 и 2, свидетельствуют о том, что контрольные образцы монокультур лактобактерий и бифидобактерий имеют высокие биологические показатели. При культивировании смеси самые высокие показатели наблюдаются при культивировании лактобактерий и бифидобактерий в соотношении 1:2.

При проведении сравнения морфологических признаков культивируемых штаммов с образцами контроля путем микроскопии подтверждено сохранение основных морфологических признаков каждого штамма при совместимом культивировании, морфология бифидобактерий и лактобацилл неизменна.

Следующим этапом работы было определение оптимальной концентрации пребиотического компонента в составе питательной среды для совместного культивирования бифидобактерий штамма *Bifidobacterium adolescentis* № 17-11 β и лактобактерий штамма *Lactobacillus plantarum* № 8 β .

Основываясь на результатах предыдущих исследований при совместном культивировании штаммов *Bifidobacterium adolescentis* № 17-11 β и *Lactobacillus plantarum* № 8 β , проводили сравнительную оценку пребиотической активности лактулозы как добавки, обеспечившей наибольшую биологическую активность указанных культур. Для этого восстановленные маточные культуры бифидобактерий в количестве 5,0% и лактобактерий в количестве 2,5% вносили в модифицированную питательную среду КДС (рН $7,0 \pm 0,1$) с содержанием лактулозы 1,0% и 1,5%. Контролем служила питательная среда КДС без добавления лактулозы. Культивирование проводили в течение 48 часов при температуре: в течение первых суток – $38,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$, а в течение вторых суток – $37,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ (таблица 3).

Для стабилизации рН в процессе роста бактериального консорциума на питательных средах с добавлением лактулозы было использовано значительно большее количество NH_3 , чем при культивировании монокультур. К среде с содержанием 1,0% лактулозы NH_3 внесли на 19,38%, с 1,5% лактулозы – на 32,95%. Активность кислотообразования также была выше при культивировании на средах с добавлением лактулозы, при содержании 1,0% – на 5,57%, при 1,5% - 7,52%. Количество живых бактерий, при культивировании на средах с добавлением лактулозы, также превышало показатели контроля. Для бифидобактерий КОЕ составляло 10^{12} , в сравнении с 10^{11} при культивировании в безлактозной среде; количество лактобактерий в среде с 1,0% лактулозы было выше чем в контроле на 17,64%, с 1,5% - 42,86% (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели активности бактериального консорциума в зависимости от источников сахаров (n=5)

Показатель активности консорциума		Лактулоза, 1,0%	Лактулоза, 1,5%
Количество добавленного 10,0% раствора NH_3 , мл		$3,08 \pm 0,18$	$3,43 \pm 0,08$
Активность кислотообразования, °Т		379 ± 5	386 ± 7
Количество бактерий, КОЕ	лактобактерии	$(5,1 \pm 0,22) \times 10^9$	$(6,0 \pm 0,17) \times 10^9$
	бифидобактерии	10^{12}	10^{12}

Таким образом, для повышения эффективности производства кормовых пробиотиков нами доказана возможность совместного культивирования бифидобактерий и лактобактерий на питательной среде с добавлением лактулозы. С учетом значений кислотообразования и количества живых бактерий признана оптимальная концентрация лактулозы 1,5%, а соотношение посевного материала в смеси в количестве 1:2 – лактобактерий к бифидобактерий соответственно.

Заключение. Доказана возможность использования при производстве кормовых пробиотиков лактулозы как пребиотического компонента в составе бактериальной смеси на основе бифидобактерий *B. adolescentis* 17-11 β и лактобактерий *L. plantarum* 8 β . Установлена ее

оптимальная концентрация (1,5%), которая увеличивает показатели биологической активности смеси: активность кислотообразования – на 7,52%, количество живых бактерий – на 42,86%.

Для повышения эффективности производства кормовых пробиотиков экспериментально обоснован состав бактериальной смеси: *L. plantarum* 8 β и *B. adolescentis* 17-11 β в соотношении 1:2 при совместном культивировании и пребиотический компонент – лактулоза (1,5%).

Conclusion. The possibility of using lactulose as a prebiotic component in the composition of a bacterial mixture based on bifidobacteria *B. adolescentis* 17-11 β and lactobacilli *L. plantarum* 8 β in the production of feed probiotics has been proved. Its optimal concentration (1.5%) has been established, which increases the indices of biological activity of the mixture: acid production activity by 7.52%, living bacteria count by 42.86%.

To increase the efficiency of the production of feed probiotics, the composition of the bacterial mixture was experimentally grounded: *L. plantarum* 8 β and *B. adolescentis* 17-11 β in a ratio of 1:2 cultivated jointly, and the prebiotic component – lactulose (1.5%).

Список литературы. 1. Сидоров, М. А. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками / М. А. Сидоров, В. В. Субботин, Н. В. Данилевская // *Ветеринария*. – 2000. – № 11. – С. 17–22. 2. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research / J. Walter // *Appl Environ Microbiol.* – 2008. – Vol. 74(16). – P. 4985–4996. doi: 10.1128/AEM.00753-08. 3. Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health / ed. S. Otlés. – 1st ed. – CRC Press. doi.org/10.1201/b15561. 4. Барановский, Ю. А. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / Ю. А. Барановский, Э. А. Кондрашина. – СПб. : Питер, 2008. – 224 с. 5. Review: Adaptation of Beneficial Propionibacteria, Lactobacilli and Bifidobacteria Improves Tolerance Toward Technological and Digestive Stresses / F. Gaucher [et al] // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 841. doi: 10.3389/fmicb.2019.00841. 6. Review: Adaptation of Beneficial Propionibacteria, Lactobacilli and Bifidobacteria Improves Tolerance Toward Technological and Digestive Stresses / F. Gaucher [et al] // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 841. doi: 10.3389/fmicb.2019.00841. 7. Малик Н. И. Пробиотики: теоретические и практические аспекты / Н. И. Малик // *Птицефабрика*. – 2006. – № 1. – С. 20–26. 8. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – № 1. – С. 184–192. 9. Организация научных исследований в животноводстве / Н. А. Маслова [и др.]. – пос. Майский, 2019. – 95 с. 10. Явников, Н. В. Изучение антагонистической активности штаммов лактобактерий и бифидобактерий против возбудителей маститов у коров / Н. В. Явников, А. В. Ткачев // *Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова*. – 2021. – № 1 (62). – С. 76–82.

References. 1. Sidorov, M. A. Normal'naya mikroflora zhivotnyh i ee korrekciya probiotikami / M. A. Sidorov, V. V. Subbotin, N. V. Danilevskaya // *Veterinariya*. – 2000. – № 11. – S. 17–22. 2. Walter J. (2008). Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol.*, 74(16), 4985–4996. doi: 10.1128/AEM.00753-08. 3. Otlés S. (Ed.). (2014). *Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15561>. 4. Baranovskij, YU. A. *Disbakterioz i disbioz kishechnika* / YU. A. Baranovskij, E. A. Kondrashina. – SPb. : Piter, 2008. – 224 s. 5. Gaucher F., Bonnassie S., Rabah H., Marchand P., Blanc P., Jeantet R., & Jan G. (2019). Review: Adaptation of Beneficial Propionibacteria, Lactobacilli and Bifidobacteria Improves Tolerance Toward Technological and Digestive Stresses. *Front. Microbiol.*, 10, 841. doi: 10.3389/fmicb.2019.00841. 6. Gaucher F., Bonnassie S., Rabah H., Marchand P., Blanc P., Jeantet R., & Jan G. (2019). Review: Adaptation of Beneficial Propionibacteria, Lactobacilli and Bifidobacteria Improves Tolerance Toward Technological and Digestive Stresses. *Front. Microbiol.*, 10, 841. doi: 10.3389/fmicb.2019.00841. 7. Malik N. I. *Probiotiki: teoreticheskie i prakticheskie aspekty* / N. I. Malik // *Pticefabrika*. – 2006. – № 1. – S. 20–26. 8. *Novoe pokolenie probioticheskikh preparatov kormovogo naznacheniya* / N. A. Ushakova [i dr.] // *Fundamental'nye issledovaniya*. – 2012. – № 1. – S. 184–192. 9. *Organizaciya nauchnyh issledovanij v zhivotnovodstve* / N. A. Maslova [i dr.]. – pos. Majsij, 2019. – 95 s. 10. Yavnikov, N. V. *Izuchenie antagonistscheskoj aktivnosti shtammov laktobakterij i bifidobakterij protiv vozбудitelej mastitov u korov* / N. V. Yavnikov, A. V. Tkachev // *Vestnik Buryatskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii im. V.R. Filippova*. – 2021. – № 1 (62). – S. 76–82.

Поступила в редакцию 15.09.2021.