

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045162**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.31

(21) Номер заявки
202293386

(22) Дата подачи заявки
2022.12.19

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
A23K 10/18 (2016.01)
C12R 1/25 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/23 (2006.01)

(54) **КОНСОРЦИУМ ШТАММОВ LACTOBACILLUS PARABUCHNERI 6, LACTOBACILLUS PLANTARUM 20, LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS 22, ENTEROCOCCUS FAECIUM 4/6, BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS 75, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, ПТИЦ, РЫБ, ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ, ЗЕМНОВОДНЫХ, БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

(31) **2022130160**

(32) **2022.11.21**

(33) **RU**

(43) **2023.10.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БУДЯКОВ АНДРЕЙ НИКОЛАЕВИЧ
(RU)**

(72) Изобретатель:
Ржевская Виктория Степановна (RU)

(74) Представитель:
Кравчук А.Г. (RU)

(56) US-B2-20020039606
US-B2-20200263221
WO-2015017625

(57) Изобретение относится к биотехнологии, а именно к производству пробиотических препаратов, и может применяться в качестве кормовых добавок для профилактики и коррекции нарушений микробиоценоза желудочно-кишечного тракта у животных, птиц, рыб, пресмыкающихся, земноводных, беспозвоночных. Консорциум обладает высокой антагонистической активностью по отношению к посторонней и болезнетворной микрофлоре.

B1

045162

045162

B1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к производству пробиотических препаратов, и может применяться в качестве кормовых добавок для профилактики и коррекции нарушений микробиоценоза желудочно-кишечного тракта у животных, птиц, рыб, пресмыкающихся, земноводных, беспозвоночных.

В животноводстве, птицеводстве и рыбоводстве в качестве кормовых добавок широко используют пробиотические препараты на основе штаммов лактобактерий рода *Lactobacillus*, энтерококков или дрожжей, которые являются монокультурными или содержат только группу микроорганизмов одного рода.

Молочнокислые бактерии и энтерококки в частности, являются ключевыми представителями облигатного микробиоценоза здорового организма и распространены, начиная с кожной поверхности, ротовой полости и заканчивая анальной полостью включительно. Антагонизм молочнокислых бактерий и энтерококков, основанный на биосинтезе антибиотических метаболитов белковой природы и кислотообразовании, обуславливает их использование в качестве биопрепаратов естественного происхождения. Молочнокислые бактерии продуцируют нуклеазы, лизоцим, витамины, усиливают активность макрофагов в организме, стимулируют секрецию антител, цитокинов, что в значительной степени способствует повышению общей иммунологической реактивности организма и установлению симбиотических отношений с бифидо- и колибактериями. Энтерококки, являющиеся представителями нормальной микрофлоры животных, обеспечивают гидролиз сахаров, синтез витаминов, расщепление жирных кислот; выполняют функции активных иммуностимуляторов, поддерживая необходимый уровень цитокинов; обеспечивают колонизационную резистентность слизистых, способствуют элиминации из кишечника патогенных бактерий.

Разработка поликультурных пробиотических препаратов связана с необходимостью получения новых высокоактивных штаммов микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры кишечника. При этом важное значение имеют ростовые свойства, интенсивность кислотообразования, антагонистическая активность по отношению к болезнетворным микроорганизмам, а также технологичность штаммов, позволяющая использовать их в технологии промышленного получения биопрепаратов.

Консорциумы по сравнению с монокультурами микроорганизмов обладают такими преимуществами, как универсальность (поливалентность), способность к саморегуляции за счет изменения соотношения численности видов, входящих в консорциум, способность утилизировать неоднородные по составу субстраты, возможность использовать бедные и менее ценные питательные среды за счет обогащения их метаболитами микроорганизмов-ассоциантов, широкомасштабное использование функциональных возможностей микроорганизмов, более высокая активность, чем у отдельного штамма (синергизм), увеличение срока хранения, меньшая стоимость, вариация норм применения, направленная на их сокращение, расширение спектра применения, связанного с микробиологией.

Известен кормовой продукт для сельскохозяйственных животных и птиц (патент РФ № 2552872, дата начала отсчета срока действия патента 28.07.2014), содержащий в своем составе сорбционный материал, молочную кислоту, янтарную кислоту, лимонную кислоту, отличающийся тем, что в качестве сорбционного материала он содержит смесь вермикулита и бентонитовой глины в соотношении (40:60)-(20:80) и дополнительно высушенную биомассу *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* при следующем соотношении ингредиентов (мас. %): молочная кислота 12,0-15,0; янтарная кислота (или ее соли) 4,0-8,0; лимонная кислота 4,0-8,0; высушенная биомасса *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* 5,0-10,0; вермикулит и бентонитовая глина до 100%.

Известна кормовая добавка для сельскохозяйственных животных "Лакто плюс" (патент РФ № 2350101, дата начала отсчета срока действия патента 20.12.2006), включающая смесь молочнокислых бактерий, отличающаяся тем, что смесь молочнокислых бактерий представлена бактериями видов *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc dextranicum* и включает смесь дрожжевых грибов видов *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Torulopsis sphaerica*, *Torulaspora delbrueskii*, *Candida kefir*, *Candida holmii*, *Candida friedrichii*, *Kluveromyces lactis*, *Kluveromyces marxianus* при следующем соотношении компонентов: при содержании смеси молочнокислых бактерий и смеси дрожжевых грибов в соотношении 3:1.

Известен консорциум штаммов *Clostridium Cellobioparum* Э-157, *Ruminococcus Flavefaciens* К-399, *Lactobacillus Acidophilus* 1082, *Propionibacterium Acnes*-83, используемый для приготовления пробиотического препарата для жвачных животных, и способ получения пробиотического препарата для жвачных животных (патент РФ № 2260043, дата начала отсчета срока действия патента 17.07.2003), принятый за прототип.

Существенным недостатком перечисленных препаратов является их сухая форма, имеющая вид порошка, и как следствие этого низкие органолептические качества, длительный срок активации после попадания в кишечник и адаптации к новым условиям. Растворение в воде сухих препаратов требует дополнительных экономических, временных и трудовых затрат, так как некоторые порошки плохо раство-

ряются в воде, в то время как жидкие - мгновенно. В отличие от сухих, жидкие пробиотические препараты можно принимать не только перорально, но и вводить в прямую кишку, нос или наносить на кожу, шерсть или перья.

Целью настоящего изобретения является получение консорциума штаммов бактерий пяти видов, обладающего комплексом свойств, присущих отдельным штаммам и характеризующегося устойчивым свойством биосинтеза ферментов, органических кислот, спиртов, а также высокой способностью подавлять патогенные и условно-патогенные бактерии, который может быть использован для приготовления жидкого пробиотического препарата для животных, птиц, рыб, пресмыкающихся, земноводных, беспозвоночных.

Консорциум получен при выращивании пяти штаммов разных видов микроорганизмов: *Lactobacillus parabuchneri* 6 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под регистрационным номером ВКМ В-3553D), *Lactobacillus plantarum* 20 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под регистрационным номером ВКМ В-3552D), *Lactobacillus acidophilus* 22 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под регистрационным номером ВКМ В-3563D), *Enterococcus faecium* 4/6 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под регистрационным номером ВКМ В-3551D), *Brettanomyces bruxellensis* 75 (депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под регистрационным номером ВКМ У-3064D). Консорциум представляет собой суспензию коричневого цвета, обладающую кисломолочным запахом. Концентрация водородных ионов pH составляет 3,0-4,0. Количество жизнеспособных клеток в 1 мл суспензии составляет, не менее КОЕ/мл:

Lactobacillus parabuchneri 6: 1×10^6

Lactobacillus plantarum 20: 1×10^6

Lactobacillus acidophilus 22: 1×10^6

Enterococcus faecium 4/6: 1×10^6

Brettanomyces bruxellensis 75: 1×10^5

Культурально-морфологические свойства консорциума.

Штамм *Lactobacillus parabuchneri* 6 выделен из самоквасных домашних кисломолочных продуктов. На твердых питательных средах образует непрозрачные, гомогенные, S-формы колонии белого цвета. Профиль колоний выпуклый, край ровный. При культивировании в жидкой питательной среде MRS образует рыхлый осадок и равномерное помутнение через 24 ч. Диаметр колоний 1-2 мм. В мазках клетки имеют вид коротких палочек, встречаются одиночные, но преимущественно в коротких цепочках. Грамположительные. Размер клеток: $1,0-1,1 \times 0,6-0,8$ мкм. Не спорообразующие, клетки не подвижны.

Штамм *Lactobacillus plantarum* 20 выделен из силосного зерна. На твердых питательных средах образует слабовыпуклые, полупрозрачные, колонии R-формы, диаметром 2,0-2,5 мм грязно-белого цвета. В жидкой питательной среде MRS образует рыхлый осадок и равномерное помутнение через 24 ч. Клетки неподвижны, неспорообразующие. В мазках клетки имеют вид палочек среднего размера, одиночные, парами, иногда в коротких цепочках. Грамположительные.

Штамм *Lactobacillus acidophilus* 22 выделен из самоквасного кисломолочного продукта. На плотных средах MRS образует слабовыпуклые, круглые, белые, полупрозрачные колонии R-формы диаметром 1,0-1,5 мм. В жидкой среде MRS наблюдается равномерное помутнение и образование рыхлого осадка через 24 ч. В мазках имеет вид прямых палочек, располагающихся поодиночке или в виде цепочек из 2-4 и более клеток. Штамм спор и капсул не имеет, грамположительный.

Штамм *Enterococcus faecium* 4/6 изолирован из эпифитной сферы растений. На плотных питательных средах образует точечные, круглые, плоские, гладкие S-формы колонии, на среде MRS - белого цвета, на среде Тернера - красного цвета, на МИС - черного цвета. Морфология: кокки, располагающиеся парами и в коротких цепочках по 4-6 клеток. Неподвижные. Спор и капсул не образуют. Грамположительные.

Штамм *Brettanomyces bruxellensis* 75 выделен из женских шишек хмеля. На среде Сабуро образует круглые колонии с ровным краем, цвет грязно-белый, диаметр - 1-2 мм. Профиль колоний выпуклый, колонии мягкие, гомогенные. В жидкой среде Сабуро наблюдается равномерное помутнение и образование рыхлого осадка через 24 ч. Клетки спор и капсул не образуют, неподвижные, истинного мицелия не образуют. Форма клеток овальная, размер: $1-2,5 \times 3-4$ мкм.

Физиолого-биохимические свойства консорциума.

Метаболизм молочнокислых бактерий *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22 и энтерококка *Enterococcus faecium* 4/6 бродильный, но возможен рост и в присутствии воздуха (факультативные анаэробы). Бактерии обладают широким спектром потребления единственных источников углерода и энергии: моно-, ди-, олигосахаридов.

Lactobacillus parabuchneri 6 сбраживает следующие углеводы: фруктоза, мальтоза, глюкоза, галактоза, манит, сорбит, манноза, сахароза. Такие углеводы, как арабиноза, рамноза, раффиноза, ксилоза штамм *Lactobacillus parabuchneri* 6 не сбраживает.

Lactobacillus plantarum 20 ферментирует следующие углеводы: сорбит, ксилоза, маннит, рафиноза, манноза, сахароза, лактоза, мальтоза, галактоза, фруктоза, глюкоза. Такие углеводы, как арабиноза, рам-

ноза, ксилроза штамм *Lactobacillus plantarum* 20 не сбраживает.

Lactobacillus acidophilus 22 сбраживает следующие углеводы: целлобиоза, фруктоза, галактоза, глюкоза, лактоза, мальтоза, манноза, сахароза.

Enterococcus faecium 4/6 ферментирует галактозу, глюкозу, мальтозу, фруктозу, маннозу, лактозу, целлобиозу, декстрин. Ферментацию арабиноза, маннита, ксилозы и сорбита *Enterococcus faecium* 4/6 не проводит.

Штаммы *Lactobacillus parabuchneri* 6 и *Lactobacillus acidophilus* 22 образуют аммиак из аргинина, а штаммы *Lactobacillus plantarum* 20 и *Enterococcus faecium* 4/6 - не образуют.

Штаммы лактобактерий *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22 и энтерококка *Enterococcus faecium* 4/6 устойчивы к факторам среды, обеспечивающим выживаемость в кишечнике: желчи, фенолам, а также солям и спиртам, обладают амило-, липо- и протеолитической активностью. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Свойства	<i>Lactobacillus parabuchneri</i> 6	<i>Lactobacillus plantarum</i> 20	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 22	<i>Enterococcus faecium</i> 4/6
Фенолоустойчивость, %	0,5	0,4	0,4	0,2
Желчеустойчивость, %	50	50	50	40
Спиртоустойчивость, %	24	20	24	22
Амилолитическая активность, см	отсутствует	отсутствует	отсутствует	6,0±0,2
Липолитическая активность	+	+	+	+
Протеолитическая активность (казеин), см	4,1	5,2	3,2	отсутствует

Анализ культуральной жидкости молочнокислых бактерий показал наличие низкомолекулярных веществ - органических кислот (г/л культуральной жидкости). Данные приведены в табл. 2.

Таблица 2

Культуральная жидкость	<i>Lactobacillus parabuchneri</i> 6	<i>Lactobacillus plantarum</i> 20	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 22	<i>Enterococcus faecium</i> 4/6
Молочная	15,8465	8,4279	18,4783	14,1569
Укусная	3,2652	7,8646	5,4784	2,7384
Масляная	3,4327	3,2578	4,95265	2,7443
Винная	0,0249	0,0024	0,0467	0,0289
Яблочная	0,2174	0,0678	0,4672	0,1748
Янтарная	0,4962	0,4789	0,6842	0,2684
Пропионовая	0,5838	0,4883	0,7537	0,4378
Капроновая	5,2753	4,7256	6,7678	5,7365

Среды культивирования.

Для *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22: молоко коровье цельное, нормализованное или обезжиренное, мясопептонный бульон с добавлением 1-2% глюкозы или лактозы, молочная сыворотка, лактоагар, агар MRS, жидкая среда MRS, мясопептонный агар, среда Reddy, среда Rogosa. Лактобактерии культивируют аэробно при температуре 37±1°C на протяжении 24-36 ч.

Для *Enterococcus faecium* 4/6: жидкая и твердая среда Эликера, жидкая и твердая среда MRS, канамицин азидно-эскулиновый агар, агар Сланец-Бергли, щелочная полимиксиновая среда, молочно-ингибиторная среда. Посевы инкубируют при температуре 37±1°C в течение 24-30 ч.

Для *Brettanomyces bruxellensis* 75: агар Сабуро, глюкозо-пептонный агар с дрожжевым экстрактом, мальт-пептонный агар, мальт-агар, картофельно-глюкозный агар, соево-сахарозный агар, соево-сахарозная среда, солодовый бульон с дрожжевым экстрактом, глюкозо-пептонная среда. Дрожжи культивируют при температуре 28°C на протяжении 24-48 ч.

Длительное хранение штаммов.

Штаммы хранят на жидкой питательной среде и на скошенном агаре при температуре 4-6°C, при этом пересев проводят 1 раз в 2 месяца или в полужидкой среде под слоем вазелинового масла, пересев - 1 раз в 6 месяцев.

Средой хранения для *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22 являются: агар MRS, жидкая среда MRS, Keddy; для *Enterococcus faecium* 4/6 - жидкая и твердая среда Эликера, канамицин азидно-эскулиновый агар, агар Сланец-Бергли, щелочная полимиксиновая среда, молочно-ингибиторная среда; для *Brettanomyces bruxellensis* 75 - агар Сабуро, жидкая среда Сабуро, глюкозо-пептонный агар с дрожжевым экстрактом, картофельно-глюкозный агар.

Консорциум штаммов *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22, *Enterococcus faecium* 4/6, *Brettanomyces bruxellensis* 75 предназначен для приготовления пробиотического препарата для животных, птиц, рыб, пресмыкающихся, земноводных, беспозвоночных, получе-

ние которого может быть осуществлено следующим способом.

Способ получения пробиотического препарата подразумевает содержание в нём в качестве основного активного компонента жизнеспособных микроорганизмов, их метаболитов и остатков культуральной среды.

При получении пробиотического препарата культивирование микроорганизмов осуществляют глубинным методом, что позволяет наиболее полно использовать компоненты питательной среды и получить препарат с максимальным содержанием микробных клеток.

Способ получения пробиотического препарата состоит из следующих этапов: подготовка посевных культур микроорганизмов из штаммов-симбионтов в лабораторных или производственных биореакторах объемом от 2 до 100 л; совместное культивирование лактобактерий: *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22, энтерококков *Enterococcus faecium* 4/6 и дрожжей *Brettanomyces bruxellensis* 75 в питательной среде.

Готовят посевную культуру каждого штамма-симбионта. Для *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22 и *Enterococcus faecium* 4/6 питательная среда содержит углеводы, источник органического азота, минеральные соли и воду. В качестве источника органического азота питательная среда может содержать гидролизат дрожжей, автолизат дрожжей, кукурузную муку, гидролизат казеина, пептон ферментативный, пептон дрожжевой, белково-витаминный концентрат. Питательную среду можно стерилизовать или использовать нестерильной и засеять посевной культурой. Культивирование осуществляют глубинным методом при перемешивании, аэрации, температуре 36°C с использованием вышеуказанной питательной среды в качестве субстрата для накопления биомассы производственных штаммов лактобактерий: *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22, продолжительность культивирования составляет 18-48 ч, а энтерококка *Enterococcus faecium* 4/6 - 24-27 ч. Указанная продолжительность культивирования обеспечивает накопление биомассы до 106-108 КОЕ/мл.

Для дрожжевой культуры *Brettanomyces bruxellensis* 75 питательную среду готовят смешиванием глюкозы и источника органического азота. Культивирование осуществляют глубинным методом при перемешивании и аэрации, при температуре 28°C в течение 36-48 ч.

Культивирование консорциума штаммов проводят в многотоннажном биореакторе (1-15 тонн) глубинным способом. Использование мелассы свекловичной или патоки кукурузной в процессе культивирования позволяет исключить другие углеводы и снизить себестоимость питательной среды, применяемой при накоплении биомассы микроорганизмов.

Питательная среда помимо углеводов содержит источник органического азота, минеральные соли и воду. В качестве источника органического азота питательная среда может содержать гидролизат дрожжей, автолизат дрожжей, кукурузную или соевую муку. Для повышения биологического потенциала пробиотического препарата, получаемую бактериальную взвесь лактобактерий *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22, энтерококка *Enterococcus faecium* 4/6, как основы консорциума штаммов, смешивают с культурой дрожжей *Brettanomyces bruxellensis* 75.

Достижимый результат совместного культивирования заключается в синергетическом эффекте данных групп микроорганизмов и повышении их биологической активности. Данные приведены в таблице 3. Увеличение зоны подавления тест-организма при совместном действии лактобактерий *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22, энтерококка *Enterococcus faecium* 4/6 и дрожжей *Brettanomyces bruxellensis* 75 по сравнению с их монокультурами, отмечено у всех тестируемых видов, т.е. антагонистическая активность монокультур выражена меньше, чем у консорциума, состоящего из этих микроорганизмов.

Таблица 3

Тест-культуры	Диаметр зоны задержки роста тест-культур, мм					
	<i>Lactobacillus parabuchneri</i> 6	<i>Lactobacillus plantarum</i> 20	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 22	<i>Enterococcus faecium</i> 4/6	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> 75	Консорциум
<i>Salmonella typhimurium</i> 144	26,3±0,6	27,1±0,5	29,3±0,4	28,8±0,5	15,3±0,5	32,1±0,6
<i>Escherichia coli</i> O 55	30,7±0,5	28,9±0,6	33,1±0,5	33,1±0,6	18,1±0,5	36,4±0,7
<i>Proteus vulgaris</i> 5	37,9±0,5	24,2±0,6	38,6±0,6	32,9±0,5	19,2±0,4	42,5±0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	29,3±0,7	31,3±0,5	31,4±0,4	31,5±0,5	18,3±0,5	36,9±0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26,3±0,5	26,3±0,5	32,0±0,4	28,1±0,6	15,8±0,5	35,0±0,6

Культивирование консорциума штаммов в производственных условиях возможно без стерилизации питательной среды при соблюдении следующих условий:

соблюдение асептических условий в производственном цехе (предварительная дезинфекция по-

верхностей антибактериальными средствами, стерилизации воздуха УФ, обработки озоном);
стерилизация биореакторов, ферментеров влажным паром или химическими методами стерилизации;

вносимый источник углеводов: меласса свекловичная, патока кукурузная - должен стерилизоваться;
химические реактивы вносят в средоварку в виде сухих солей, после полного растворения которых, происходит их тщательное перемешивание;

подачу стерильной дистиллированной воды производят в биореактор из установки обратного осмоса;

поступающая в биореактор вода должна иметь температуру 30-37°C;

внесение посевной культуры каждого штамма микроорганизма в питательную среду, предназначенную для совместного культивирования.

При глубинном культивировании, перемешивании и аэрации при температуре 30-37°C, продолжительности культивирования 48-72 ч, кислотность культуральной жидкости составляет 3,0-4,0. Смешивание бактериальных взвесей производят в соотношении, обеспечивающем содержание жизнеспособных бактерий каждого штамма в количестве не менее 10^6 КОЕ/мл, а дрожжей - не менее 10^5 КОЕ/мл, в получаемом пробиотическом препарате.

Возможен отдельный учет КОЕ каждого штамма с помощью простых и общедоступных способов, благодаря выраженным межвидовым различиям. Количество КОЕ в 1 мл взвеси лактобактерий: *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22 - определяют с помощью стандартного метода посева на плотную среду МРС и подсчета выросших колоний после инкубирования в аэробных условиях (поверхностный способ посева) или условиях ограниченного доступа воздуха (глубинный способ посева). Определение присутствия и подсчет количества энтерококков *Enterococcus faecium* 4/6 проводят на плотных питательных средах (Агар Сланец-Бертли, среде Тернера, щелочная полимиксиновая среда, молочно-ингибиторная среда), на которых *Enterococcus faecium* 4/6 образуют колонии в зависимости от среды - от черного и серого цвета до красного цвета. Определение присутствия и подсчет количества дрожжевых клеток *Brettanomyces bruxellensis* 75 исследуют стандартным способом. Указанные методики позволяют проводить отдельный учет бактериальных и дрожжевых клеток в смешанной культуре микроорганизмов как в суспензии, так и в сухой форме.

Биологическая безопасность при производстве консорциума штаммов заключается в том, что наличие мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерий группы кишечных палочек (колиформы), патогенных микроорганизмов, в т.ч. сальмонеллы, не допускается.

Культивирование консорциума штаммов ведется до максимального накопления микробных клеток. Готовый и прошедший контроль консорциум штаммов можно использовать для производства товарных форм препарата.

Примеры получения пробиотического препарата на основе консорциума штаммов *Lactobacillus parabuchneri* 6, *Lactobacillus plantarum* 20, *Lactobacillus acidophilus* 22, *Enterococcus faecium* 4/6, *Brettanomyces bruxellensis* 75.

Пример 1.

Консорциум готовят из штаммов-симбионтов. Питательная среда состоит из смеси патоки кукурузной, солей калия и натрия, дрожжевого автолизата и воды. Она содержит водорастворимых углеводов 8% по массе, всего углеводов 11% по массе, общего азота 3,5% по массе. Питательную среду стерилизуют и вносят в нее посевные культуры каждого штамма-симбионта. Культивирование осуществляют глубинным методом при перемешивании и аэрации при температуре 32-36°C в течение 72 ч. Культуральную жидкость охлаждают и фасуют в полимерные флаконы.

Жидкая форма пробиотического препарата содержит суспензию микробных клеток, не менее КОЕ/мл:

Lactobacillus parabuchneri 6 - 1×10^6

Lactobacillus plantarum 20 - 1×10^6

Lactobacillus acidophilus 22 - 1×10^6

Enterococcus faecium 4/6 - 1×10^6

Brettanomyces bruxellensis 75 - 1×10^6 .

Пример 2.

Консорциум готовят из штаммов-симбионтов. Питательная среда состоит из смеси мелассы свекловичной, минеральных солей и воды. Она содержит водорастворимых углеводов 6% по массе, всего углеводов 7,5% по массе, общего азота 3,1% по массе. Питательную среду стерилизуют и вносят в нее посевную культуру каждого штамма-симбионта. Культивирование осуществляют глубинным методом до максимального накопления микробных клеток и снижения pH культуральной жидкости менее 4,0. Культуральную жидкость концентрируют до содержания вещества 15% и вводят в сырье для производства корма для животных. Получен корм для животных с содержанием микробных клеток, не менее КОЕ/г:

Lactobacillus parabuchneri 6 - 1×10^6

Lactobacillus plantarum 20 - 1×10^6
 Lactobacillus acidophilus 22 - 1×10^6
 Enterococcus faecium 4/6 - 1×10^6
 Brettanomyces bruxellensis 75 - 1×10^6 .
 Пример 3.

Консорциум готовят из штаммов-симбионтов. Питательная среда состоит из смеси патоки кукурузной, натрия хлористого, дрожжевого автолизата и воды. Она содержит водорастворимых углеводов 8% по массе, всего углеводов 11% по массе, общего азота 2,7% по массе. В питательную среду вносят посевные культуры микроорганизмов. Культивирование осуществляют глубинным методом до максимального накопления микробной массы при температуре 32-34°C, в течение 72 ч. Культуральную жидкость концентрируют до содержания вещества 15% и вводят в сырье для производства корма для животных. Получают пробиотический препарат для жвачных животных с содержанием жизнеспособных клеток микроорганизмов не менее КОЕ/г:

Lactobacillus parabuchneri 6 - 1×10^{10}
 Lactobacillus plantarum 20 - 1×10^{10}
 Lactobacillus acidophilus 22 - 1×10^{10}
 Enterococcus faecium 4/6 - 1×10^{10}
 Brettanomyces bruxellensis 75 - 1×10^7 .
 Пример 4.

Влияние консорциума штаммов на привес птицы определяли по среднесуточному привесу птицы и среднему весу тушки на 47 сутки. Консорциум выпаивали птице в количестве 1 л/т питьевой хлорированной воды, в течение всего срока выращивания птицы (47 дней), за исключением дней вакцинации. У опытной группы, принимавшей консорциум, среднесуточный привес увеличился на 2,3 г, средний вес увеличился на 104 г, сохранность повысилась на 0,4%.

Одной из сопутствующих проблем при выращивании бройлера является колибактериоз, представляющий собой локальную инфекцию вторичного характера. В контрольной группе количество птиц с колибактериозом за период выращивания составило 1,5-5% от поголовья, в опытной - 0,1-0,5% и регистрировался только на отстающей в росте птице.

Золотистый стафилококк, который также является постоянным спутником промышленного птицеводства, является причиной поражения конечностей птицы. В контрольной группе поражение составило 0,5-3%, в опытной - поражение конечностей у птиц встречалось в единичных случаях.

Применение консорциума штаммов Lactobacillus parabuchneri 6, Lactobacillus plantarum 20, Lactobacillus acidophilus 22, Enterococcus faecium 4/6, Brettanomyces bruxellensis 75 дало ощутимый экономический эффект, за счет сохранения поголовья, снижения уровня выбраковки птиц, увеличения среднесуточного привеса, как итог - увеличение производства мяса птицы.

Полученный консорциум штаммов Lactobacillus parabuchneri 6, Lactobacillus plantarum 20, Lactobacillus acidophilus 22, Enterococcus faecium 4/6, Brettanomyces bruxellensis 75 обладает высокой антагонистической активностью, по отношению к посторонней и болезнетворной микрофлоре и может быть использован для приготовления пробиотического препарата для профилактики и коррекции нарушений микробиоценоза желудочно-кишечного тракта у животных, птиц, рыб, пресмыкающихся, земноводных, беспозвоночных.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Консорциум штаммов Lactobacillus parabuchneri 6, Lactobacillus plantarum 20, Lactobacillus acidophilus 22, Enterococcus faecium 4/6, Brettanomyces bruxellensis 75, используемый для приготовления пробиотического препарата для животных, птиц, рыб, пресмыкающихся, земноводных, беспозвоночных.

