

(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 кислomолочным 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 кислomолочных 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 кислomолочного 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.

