УДК 663.087.8:638.1:602(476)

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ ПЧЕЛ

Р. К. Нагорный[1], И. М. Лойко[2], Т. М. Скудная[2], А. Г. Щепеткова[2], Н. А. Старикова[2]

[1] – Институт микробиологии НАН Беларуси
г. Минск, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 220114, г. Минск, ул. Купревича,2; e-mail: microbio@mbio.bas-net.by);
[2]– УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

Ключевые слова: *Apis Mellifera, пробиотик, кормовая добавка, Bacillus Subtilis, пробиотические микроорганизмы, криопротекторная среда, лиофилизация.*

Аннотация. *В ходе исследований определены оптимальные параметры получения пробиотической кормовой добавки для пчел. Основой пробиотической кормовой добавки для пчел является высокоактивный штамм спорообразующих бактерий B. subtilis БИМ В-454 Д. Температурный оптимум для глубинного культивирования штамма в шейкере-инкубаторе составляет 30±2°С, частота вращения – 200±20 об./мин, продолжительность культивирования – 72±2 ч. Установлено, что жизнеспособность бактерий B. subtilis БИМ В-454Д в составе сухой пробиотической добавки «Апипро» остается стабильно высокой в течение 9 мес хранения вне зависимости от температурных условий.*

PROCESS PARAMETERS OF RECEIVING PROBIOTIC FEED ADDITIVE FOR BEES

R. K. Nahorny[1], I. M. Loiko[2], T. M. Skudnaya[2], A. G. Shchapiatkova[2], N. A. Starykava[2]

[1] – Institute of Microbiology, National Academy of Sciences
Minsk, Republic of Belarus
(Republic of Belarus, Minsk, 220114, 2 Kuprevicha st.; e-mail: microbio@mbio.bas-net.by);
[2] – EI «Grodno state agrarian university»
Grodno, Republic of Belarus
(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

Key words: *Apis Mellifera, probiotic, feed additive, Bacillus Subtilis, probiotic microorganisms, cryotyre-tread environment, liofilization.*

Summary. *In the course of the research, the optimal parameters for obtaining a probiotic feed additive for bees were determined. Basis of probiotic feed additive for bees is the highly active strain the of bacteria B. subtilis BIM V-454 D. The temperature optimum for deep cultivation of a strain in a shaker incubator makes 30±2°C, rotating speed 200±20 about./mines, duration of cultivation is 72±2 h. It is established that the viability of bacteria of B. subtilis of BIM V-454D as a part of a bulk Apipro probiotic additive remains steadily high within 9 months of storage regardless of temperature conditions.*

(Поступила в редакцию 03.06.2019 г.)

Введение. Применение пробиотических препаратов в пчеловодстве позволяет предотвращать гибель пчел от вирусных болезней в весенне-летний период, оздоравливать пчелиные семьи, быстро наращивать их силу, получать больше отводков, меда и других продуктов пчеловодства [4].

Очевидна необходимость и перспективность проведения в Республике Беларусь исследований по использованию отечественных пробиотических препаратов в пчеловодстве, уже опробованных в ветеринарной практике (Билавет, Лактимет, Бацинил, Бацинил-К и др.). Это позволит повысить эффективность их использования и расширить область применения. Применением пробиотиков нового поколения достигнута высокая их антагонистическая активность к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; высокая ферментативная активность; устойчивость к литическим ферментам; технологичность в производстве; стабильность при хранении; экологическая безопасность.

В отличие от лакто- и бифидобактерий культуры *Bacillus*, как сапрофиты, способны длительно существовать в окружающей среде за счет их генетически детерминированной способности к продукции различных групп ферментов, антибиотиков, а также спорообразованию. Стимулируется размножение лакто-, бифидобактерий и других представителей индигенной микробиоты, в свою очередь, синтезирующих аминокислоты (в т. ч. незаменимые) и витамины, которые на микроэкологическом уровне усиливают комплексное лечебно-профилактическое действие спорообразующих пробиотиков [1, 2, 3].

Цель работы – разработка опытно-промышленной технологии получения пробиотической кормовой добавки на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus*.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на базе Института микробиологии НАН Беларуси. Для получения и проверки качественных показателей пробиотической кормовой добавки Апипро использовали следующие питательные среды (г/л):

1) меласса – 30,0; KH_2PO_4– 3,0; $K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$ – 7,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; Na-цитрат×3 H_2O – 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5; вода водопроводная – до 1 л, pH 7,0±0,2; 2) БХ – 2%-й агар, pH 6,8±0,2; 3) солодовое агаризованное сусло; 4) Среда Эндо.

Культуру бактерий *B. subtilis* БИМ В-454Д (основу кормовой добавки «Апипро») хранили в холодильнике при температуре +4°С в пробирках на скошенном мясо-пептонном агаре, pH 7,0; перевивка – 1 раз в 6 мес.

Условия глубинного культивирования: спорообразующие бактерии *B. subtilis* БИМ В-454Д выращивали глубинно на среде 1 в орбитальном шейкере-инкубаторе при температуре (30±2)°С и частоте вращения (200±20) об./мин в течение 72±2 ч.

Параметры концентрирования биомассы бактерий: культуральную жидкость бактерий *B. subtilis* БИМ В-454 Д с титром не менее 1×10^9 КОЕ/мл охлаждали до температуры 15-20°С, с соблюдением правил асептики разливали в центрифужные пробирки по 230 мл, после чего проводили центрифугирование на HERMLE Z36HK (частота вращения – 10000 об./мин, температура 4°С, продолжительность – 10 мин).

Условия лиофильного высушивания: концентрат биомассы бактерий *B. subtilis* БИМ В-454 Д смешивали с криопротекторной сахарозной средой (10%), содержащей биологически активные добавки, после чего разливали по 3 мл в стерильные пенициллиновые флаконы и замораживали в морозильной камере DF при температуре -70°С не менее 16 ч. После окончания процесса замораживания флаконы быстро помещали на полки лиофильной сушилки Labconco, предварительно охлажденные до -25°С. Параметры сушки кормовой добавки:

– Сегмент 1 t -25°С, время – 2 ч (скорость охлаждения 1,4°С/мин).

– Сегмент 2 t -20°С, время – 8 ч (скорость прогревания 1,4°С/мин).

– Сегмент 3 t 0°С, время – 6 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин).

– Сегмент 4 t +20°С, время – 8 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин).

Титр жизнеспособных клеток (КОЕ/$см^3$) и спор (спор/$см^3$) спорообразующих бактерий определяли методом последовательных разведений.

Наличие посторонних микроорганизмов устанавливали с использованием селективных питательных сред для определения дрожжей, плесневых грибов, бактерий группы *Escherichia coli* и других аэробных бактерий.

Для выявления дрожжей и плесневых грибов в образцах кормовой добавки применяли солодовое агаризованное сусло (СА). Ход определения: СА, в расплавленном на водяной бане виде, соблюдая стериль-

ность, разливали по 15 см³ в стерильные чашки Петри. После застывания среды чашки Петри подсушивали в термостате при температуре (37±1)°С с целью удаления капель влаги с крышек. Затем стерильной пипеткой на поверхность питательной среды в чашках Петри наносили по 0,1 см³ растворенной кормовой добавки и равномерно стерильным стеклянным шпателем распределяли его по поверхности. Засеянные чашки Петри помещали в термостат с температурой (29±1)°С, анализ посевов проводили визуально через 5 сут.

Для выявления бактерий группы *Escherichia coli* в образцах кормовой добавки использовали агаризованную среду Эндо. Ход определения: среду Эндо, приготовленную непосредственно перед анализом, соблюдая стерильность, разливали в стерильные чашки Петри по 15 $см^3$. После застывания среды чашки Петри подсушивали в термостате при температуре (37±1)°С с целью удаления капель влаги с крышек. Затем стерильной пипеткой на поверхность питательной среды в чашках Петри наносили по 0,1 $см^3$ растворенной кормовой добавки и равномерно распределяли его по поверхности. Засеянные чашки Петри помещали в термостат с температурой (37±2)°С, анализ посевов проводили визуально через 3 сут.

Результаты исследований и их обсуждение. В качестве основы пробиотической кормовой добавки для пчел «Апипро» используется высокоактивный штамм спорообразующих бактерий *B. subtilis* БИМ В-454 Д – основа ветеринарного препарата «Бацинил-К». В ходе исследований установлено, что температурный оптимум для глубинного культивирования штамма *B. subtilis* БИМ В-454 Д в шейкере-инкубаторе составляет 30±2°С, частота вращения – 200±20 об./мин, продолжительность культивирования – 72±2 ч. Для выращивания культуры использовалась питательная среда 1, активная кислотность среды – 7,0-7,2. С целью оптимизации технологических параметров высушивания кормовой добавки в качестве криопротекторной среды испытаны растворы сахарозы в концентрации от 5 до 15%. В таблице 1 приведены показатели титра клеток и спор бактерий сразу после высушивания и через месяц хранения при +4°С.

Таблица 1 – Влияние концентрации криопротекторной среды на титр бактерий *B. subtilis* БИМ В-454 Д после лиофильного высушивания

Концентрация сахарозной криопротекторной среды, %	Титр *B. subtilis* БИМ В-454 Д, КОЕ/г	
	0 сут	1 мес
5	$1{,}0\times10^{11}$	$5{,}0\times10^{10}$
10	$7{,}0\times10^{11}$	$7{,}0\times10^{11}$
15	$7{,}1\times10^{11}$	$7{,}0\times10^{11}$

Перед добавлением криозащитной среды биомассу бактерий концентрировали в центрифуге при частоте вращения 10000 об./мин, температуре 4°С в течение 10 мин, титр концентрата составлял $2{,}1\times10^{12}$ КОЕ/мл. Биологически активные добавки (дрожжевой экстракт и сульфат кобальта) добавляли непосредственно в криопротекторную среду. Из данных таблицы 1 следует, что наилучшие показатели титра *B. subtilis* БИМ В-454 Д после лиофильного высушивания достигаются при использовании криопротекторной сахарозной среды в концентрации 10 и 15% (титр, КОЕ/г: $7{,}0\times10^{11}$ и $7{,}1\times10^{11}$ соответственно – сразу после сушки; $7{,}0\times10^{11}$ – через месяц хранения для обоих вариантов), в то время как 5% сахарозная среда обеспечила наименьшую сохранность титра бактерий ($1{,}0\times10^{11}$ КОЕ/г – сразу после сушки; $5{,}0\times10^{10}$ – через месяц хранения). На основании полученных данных в качестве криопротекторной среды, обеспечивающей максимальную сохранность жизнеспособных бактерий *B. subtilis* БИМ В-454 Д после лиофилизации с минимальными материальными затратами, выбрана 10%-я сахарозная среда.

Результаты испытания режимов лиофильного высушивания кормовой добавки представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние режима лиофилизации на показатели кормовой добавки «Апипро»

Показатели	Режим лиофилизации		
	1	2	3
Титр *B. subtilis* БИМ В-454 Д, КОЕ/г	$7{,}0\times10^{10}$	$9{,}0\times10^{9}$	$1{,}0\times10^{10}$
Внешний вид, цвет	Сухая масса светло-бежевого цвета	Влажная масса светло-бежевого цвета	Влажная масса светло-бежевого цвета

Примечание: Режим 1: замораживание при -70°С в течение 16 ч; лиофильное высушивание в 4 этапа:а) -25°С, 2 ч (скорость охлаждения 1,4°С/мин), б) -20°С, 8 ч (скорость прогревания 1,4°С/мин), в) 0°С, 6 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин), г) +20°С, 8 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин);

Режим 2: замораживание при -70°С в течение 16 ч; лиофильное высушивание в 4 этапа: а) -25°С, 1 ч (скорость охлаждения 1,4°С/мин), б) -20°С, 3 ч (скорость прогревания 1,4°С/мин), в) 0°С, 3 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин), г) +20°С, 5 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин);

Режим 3: замораживание при -70°С в течение 16 ч; лиофильное высушивание в 4 этапа: а) -25°С, 2 ч (скорость охлаждения 1,4°С/мин), б) -20°С, 5 ч (скорость прогревания 1,4°С/мин), в) 0°С, 2 ч

(скорость прогревания 0,5°С/мин), г) +20°С, 5 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин)

Из данных таблицы 2 следует, что наиболее оптимальным из испытанных режимов лиофильного высушивания кормовой добавки является режим 1, обеспечивающий получение сухой массы с высоким титром жизнеспособных клеток.

В оптимизированных лабораторных условиях наработан экспериментальный образец кормовой добавки в количестве 4200 доз для проведения испытаний эффективности на пчелах. Показано, что титр жизнеспособных клеток бактерий *B. subtilis* БИМ В-454Д в составе экспериментального образца пробиотической кормовой добавки составляет $3,7\times10^{10}$ КОЕ/г, посторонняя микрофлора отсутствует.

По органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям готовая кормовая добавка «Апипро» должна соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 3.

Таблица 3 – Основные показатели кормовой добавки

Наименование показателя	Характеристика и нормы
Внешний вид, цвет	Сухая масса, от светло-бежевого до коричневого цвета, допускается неоднородность окраски
Запах	Слабый, специфический для данного продукта
Растворимость	В питательной среде или в физиологическом растворе в объеме, соответствующем объему до высушивания, в течение 1-3 мин содержимое флакона должно раствориться с образованием гомогенной мутной суспензии желтовато-бежевого цвета
Титр *B. subtilis*, КОЕ/г, не менее	1×10^9
Наличие посторонних микроорганизмов: - дрожжей, плесневых грибов, КОЕ/г, не более - бактерий группы *E. coli*	 1×10^3 Не допускается

В соответствии с требованиями регламента ЛР/5-2018 наработан экспериментальный образец пробиотической кормовой добавки «Апипро» в количестве 800 доз для проведения ветеринарно-токсикологической экспертизы, испытаний эффективности, безвредности и безопасности.

Изучена стабильность сухой кормовой добавки «Апипро» для пчел в течение 9 мес хранения в различных температурных режимах. В результате проведенных исследований установлено, что жизнеспособность бактерий *B. subtilis* БИМ В-454Д в составе сухой пробиотической

добавки «Апипро» остается стабильно высокой (титр КОЕ/г и спор/г не менее $1{,}0\times10^{10}$) в течение 9 мес хранения вне зависимости от температурных условий. Наличие посторонней микрофлоры (плесневых грибов и бактерий группы *Escherichia coli*) не выявлено на протяжении всего срока хранения.

Заключение. Таким образом, в лабораторных условиях оптимизированы технологические параметры получения пробиотической кормовой добавки для пчел «Апипро» в сухом виде: глубинное культивирование в шейкере-инкубаторе при температуре 30±2°С, частоте вращения 200±20 об./мин в течение 72±2 ч; концентрирование биомассы бактерий в центрифуге при частоте вращения 10000 об./мин, температуре 4°С в течение 10 мин; добавление криозащитной среды (10% сахароза) и биологически активных добавок; замораживание кормовой добавки в морозильнике при температуре -70°С в течение 16 ч; лиофильное высушивание кормовой добавки в 4 этапа: а) -25°С, 2 ч (скорость охлаждения 1,4°С/мин), б) -20°С, 8 ч (скорость прогревания 1,4°С/мин), в) 0°С, 6 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин), г) +20°С, 8 ч (скорость прогревания 0,5°С/мин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ляпунов, Я. З. Энтеробактерии кишечника зимующих пчел Apis mellifera mellifera L. / Я. З. Ляпунов, Р. З. Кузяев, Р. Г. Хисматуллин, О. А. Безгодова // Микробиология. – 2008. – № 3. – Т. 77. – С. 421-428.

2. Маркова, Ю. А. Выделение бактерий семейства Enterobacteriaceae из растительных тканей / Ю. А. Маркова, А. С. Романенко, А. В. Духанина // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – № 5. – С. 663-666.

3. Масленикова, В. И. Терапевтическая эффективность препарата ТАНГ при европейском гнильце / В. И. Масленикова, Т. И. Сычева, Т. Н. Раздорожная // Материалы науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения Г. Ф. Таранова / НИИП. – Рыбное, 2007. – С. 56-59.

4. Пшеничная, Е. А. Стимулирующие подкормки и зимовка пчел / Е. А.Пшеничная // Издательство «Колос». – М.: Журнал «Пчеловодство». – 2010. – № 10.