



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ОБЩА И ПРОМИШЛЕНА МИКРОБИОЛОГИЯ“

Характеризиране, ефективност и поносимост на пробиотичната добавка Лактина при животни

Автореферат на дисертация

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
Професионално направление 4.3 Биологически науки (Микробиология)

Николай Теодоров Карапетков

Научни ръководители: проф. д-р П. Мончева
проф. д-р С. Сурджийска

Научно жури: проф. д-р Пенка Мончева - СУ "Св. Кл. Охридски"
доц. д-р Петя Христова - СУ "Св. Кл. Охридски"
проф. д-р Илия Илиев - ПУ "Паисий Хилендарски"
проф. д-р Нели Георгиева - ХТМУ, София
проф. д-р Вяра Иванова - УХТ, Пловдив

София, 2018

Дисертационният труд е написан на 157 страници, съдържа 48 фигури и 50 таблици. Цитирани са 205 източника. Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет на заседание на факултетен съвет, състояло се на 15.01.2018.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на _____ от _____ часа в заседателната зала на БФ.

Резюме

Целта на дисертационния труд е оценка на основните функционални характеристики на шест щама млечнокиселите бактерии, *Lactobacillus acidophilus* NBIMCC 8242, *Lactobacillus helveticus* NBIMCC 8269, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* NBIMCC 8250, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NBIMCC 8244, *Streptococcus thermophilus* NBIMCC 8253 и *Enterococcus faecium* NBIMCC 8270, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина и охарактеризиране на нейния биологичен ефект като добавка към комбинирани фуражи за животни.

За потвърждаване на чистотата и идентичността на щамовете те са характеризирани по морфологични и физиолого-биохимични характеристики, включващи реакция по Грам, каталазна активност, клетъчна морфология, морфология на колонии, формиране на газ от глюкоза, киселинна активност по Търнер, коагулиране на мляко, ферментационен профил чрез системата API 50 CH и ензимен профил чрез APIZYM (Biomeieux, France). На базата на тези анализи е потвърдена видовата принадлежност на всички щамове.

Изследван е генетичният профил на *E. faecium* NBIMCC 8270 по отношение на 9 гена, кодиращи основни фактори на патогенност при ентерококите, като е установено, че той е безопасен компонент на пробиотична добавка Лактина и годен за приложение при животни.

В условия *in vitro* е направена оценка на основните функционални характеристики на щамовете, влизащи в състава на добавката Лактина, които включват транзитна толерантност в условия, симулиращи гастро-интестиналния тракт, адхезионна способност като механизъм за трайна колонизация в ГИТ, антимикробната активност и чувствителност към антибиотици. Щамовете, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина притежават добра *in vitro* устойчивост към условия, симулиращи гастроинтестиналния тракт, която е по-добра при *S. thermophilus* NBIMCC 8253 и *E. faecium* NBIMCC 8270 в сравнение с лактобацилите, което ги прави приложими в качеството на добавка към фуражи за животни.

Щамовете се характеризират с умерена (между 2.67 и 7.27%) до висока (от 23 до 65%) адхезираща способност, което е предпоставка те да колонизират епителните повърхности с възможност да станат част от постоянната микрофлора на гастро-интестиналния тракт.

Антибактериалната активност на щамовете се дължи главно на синтезираната от тях млечна киселина и само за три от щамовете (*L. acidophilus* NBIMCC 8242 *L. helveticus* NBIMCC 8269 и *L. lactis* NBIMCC 8764) и на вещества, вероятно с друга химична природа.

Чувствителността на млечнокиселите бактерии към антибиотици е видово и щамово специфична и не съществува риск от трансфер на детерминанти за устойчивост към най-често използваните в животновъдството антибиотици еритромицин, тетрациклин и хлорамфеникол.

Анализирана е генетичната стабилност на щамовете чрез PCR-RAPD анализ при различни начини на съхранение, като е установено, че тя се запазва независимо от условията на съхранение.

Направена е характеристика на биологичното действие на пробиотичната добавка Лактина по отношение на редица показатели като живо тегло, дневен прираст, консумация и оползотворяване на фураж, разход на фураж за един kg прираст, индекс на продуктивност, здравословен статус и клинични показатели при два вида експериментални животни (зайци и пилета), приемали различни дози от добавен към фуража пробиотик. На базата на тези анализи е установена оптималната доза на пробиотика, която е 700 g/t и 500 g/t за зайци и пилета, съответно, осигуряваща най-висока ефективност на добавката.

Проведени са експерименти в условия *in vivo* с двата вида опитни животни за установяване на поносимостта им към пробиотика, при неговото приемане в оптимална, десетократно и стократно по-висока доза. Не се установява неблагоприятно влияние върху изброените по-горе показатели, характеризирани състоянието на третираните животни и ефективността от приема на добавката.

На базата на опити с овце, заразени с *E. coli* non-O157 STEC и получавали или не пробиотичната добавка е установено, че приемането на добавката от овцете има за резултат намаляване на отделянето на STEC с фекалиите.

Благодарности

Тази дисертация се основава на експериментална работа във фирма Лактина и Биологическия факултет на Софийския университет от 2013 до 2017. През това време многобройни хора ми даваха ценни съвети, окуражаваха ме и подкрепяха моята работа. Изказвам сърдечната си благодарност на научните ми ръководители проф. д-р Пенка Мончева и проф. д-р. Събка Сурджийска, под ръководството, на които разработих дисертационния си труд и чиято подкрепа и съвети ценя високо.

На всички настоящи и бивши колеги във фирма Лактина, град Баня съм благодарен за създаване на приятна среда за работа и размисли. Бих искал да благодаря за финансовата подкрепа от фирмата, която осигури възможност за провеждане на опитите и за получаване на знания и резултати в лабораторни и полеви условия.

Бих искал да благодаря на Господ за възможността, помощта и мъдростта, които ми даде, за да започна и завърша настоящата работа!

Съкращения

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony forming unit
DFM	Direct Fed Microbials
DVS	Direct vat starter
EFSA	European food safety authority Европейският орган за безопасност на храните
FEEDAP	Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
IgM	<i>Immunoglobulin M</i>
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
MPN method	Most probable number method
NBIMCC	National bank of industrial microorganisms and cell cultures
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
QPS	Qualified presumption of safety
STEC	Шига токсин-продуциращи <i>Escherichia coli</i>
ГИТ	Гастро-интестинален тракт
г	грам
ЕС	<i>Европейски съюз</i>
kcal	килокалория
kg	килограм
МКБ	млечнокисели бактерии
МПБ	месопептонен бульон
НБПМКК	Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури
СОМ	Сухо обезмаслено мляко
s	секунда

Увод

Пробиотиците се намират в сегмент от пазара с бурно развитие в групата на функционалните храни, където в последните години се извършва значителна изследователска работа с цел създаването на нови пробиотични продукти, както за хора, така и за животни. По отношение на животните те придобиват все по-голямо значение като алтернатива на нутритивните антибиотици и се използват успешно като добавка към фуража с цел повлияване по естествен начин върху съотношението между патогенните и полезните микроорганизми в храносмилателния тракт на животните. За разлика от антибиотиците, при тях не се касае за определени бактериални метаболитни продукти, които действат потискащо и инхибират определени микроорганизми, а самите пробиотици са живи микроорганизми, които влияят чрез положителна промяна на баланса между видовете микроорганизми в макроорганизма и по този начин въздействат върху здравето и продуктивността на животните. Проблемите, произтичащи от дисбаланса в храносмилателната система се проявяват най-често при млади животни, при стресови ситуации, при храносмилателни смущения и при смяна на фуражните смеси. Твърде често в практиката тези фактори влияят едновременно, което води до появата на проблеми, свързани с патогенни микроорганизми в храносмилателния тракт на животните.

Лактина е български пробиотик, производство на фирма Лактина ООД, гр. Баня. Фуражната добавка съдържа лиофилизирани чисти култури от *Lactobacillus bulgaricus* NBIMCC 8244, *Lactobacillus acidophilus* NBIMCC 8242, *Lactobacillus helveticus* NBIMCC 8269, *Lactobacillus lactis* NBIMCC 8764, *Streptococcus thermophilus* NBIMCC 8253 и *Enterococcus faecium* NBIMCC 8270 с общ брой микроорганизми $9,5 \times 10^9$ CFU/g и съдържание на млечна киселина 2-2,6%. Той е регистриран от Европейския орган по безопасност на храните като пробиотична добавка към комбинирани фуражи за прасенца сукалчета.

Богатството на нашата страна на уникални щамове млечнокисели бактерии и натрупаният опит на специалистите дават възможност да се разработи нов пробиотик на базата на млечнокисели бактерии, който е предмет на изследователската работа в тази научна разработка.

I. Цел и задачи

Основна цел на дисертацията е оценка на основните функционални характеристики на млечнокиселите бактерии, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина и охарактеризиране на нейния биологичен ефект като добавка към комбинирани фуражи за животни.

За реализиране на целта са поставени следните по-важни задачи за изпълнение:

1. Характеристика на млечнокиселите бактерии, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина
 - 1.1. Морфологична характеристика
 - 1.2. Физиолого-биохимична характеристика
 - 1.3. Потвърждаване на видовата принадлежност чрез API 50 CH
2. Изследване на *E. faecium* NBIMCC 8270 за наличие на вирулентни гени
3. *In vitro* оценка на основните функционални характеристики на щамовете от пробиотична добавка Лактина
 - 3.1. Оценка на транзитната толерантност на щамовете в условия, симулиращи гастро-интестиналния тракт (ГИТ)
 - 3.2. Характеризиране на адхезионната способност на млечнокиселите бактерии от добавката като механизъм за трайна колонизация в ГИТ
 - 3.3. Антимикробна активност
 - 3.4. Оценка на чувствителност към антибиотици
4. Проверка на генетичната стабилност на щамовете, влизащи в добавката
5. Характеристика на биологичния ефект на пробиотик Лактина в условия *in vivo*
 - 5.1. Установяване на ефективността на добавката Лактина при експериментални животни
 - 5.2. Установяване на поносимостта на добавката Лактина при експериментални животни
 - 5.3. Влияние на пробиотика Лактина върху кланичните показатели на животни
 - 5.4. Изследване на ефекта на пробиотика върху *E. coli* non-O157H STEC при овце

II. Материали и методи

МАТЕРИАЛИ

4.1. Микроорганизми

Обект на изследване в настоящата дисертация са млечнокисели бактерии (МКБ), изолирани от домашно приготвени млечни продукти или плодове, които са съставна част на пробиотик Лактина.

В различните експерименти от дисертацията са използвани следните референтни щамове:

- *E. coli* EDL 933 (ATCC 700927) и *E. coli* K12 (ATCC 47076), *E. coli* non-O157:H STEC, SJ3 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) (изследване за влияние на пробиотика върху *E. coli* non-O157: H7 STEC при овце)
- *Enterococcus faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekkr319) *E. faecium* щам L-3 (Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia), (изследване на *E. faecium* NBIMCC 8270 за наличие на гени за вирулентност)
- *E. faecalis* ATCC 29212 (чувствителност към антибиотици)
- *Staphylococcus aureus* NBIMCC 3703, *E. coli* NBIMCC 3702, *Bacillus cereus* NBIMCC 1085, *Candida albicans* NBIMCC 74 (антибактериална активност)
- *L. helveticus* ATCC 15009, *L. acidophilus* ATCC 4356 (ензимна активност)
- *Lactobacillus casei shirota* (YIT 9029), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) (адхезионна способност)
- *E. faecalis* ATCC 27812 (генетичната стабилност на пробиотичните щамове)

Таблица 1. Щамове участващи в пробиотика

Година	Щам	Място на изолиране	Номер в колекцията
2002	<i>L. acidophilus</i> № 180	България	NBIMCC 8242
2002	<i>L. helveticus</i> № 179	България	NBIMCC 8269
2002	<i>L. lactis</i> № 182	България	NBIMCC 8250
2002	<i>L. bulgaricus</i> № 187	България	NBIMCC 8244
2002	<i>S. thermophilus</i> № 205	България	NBIMCC 8253
2004	<i>E. faecium</i> № E-253	България	NBIMCC 8270

4.2. Носители

4.3. Хранителни среди

МЕТОДИ

4.5. Характеризиране на щамовете влизащи в състава на пробиотичната добавка Лактина

4.5.1. Морфо-физиологични и биохимични характеристики

4.5.2. Потвърждаване на идентификацията на щамовете от пробиотика

4.6. *In vitro* транзитна толерантност на лиофилизирани култури в условия симулиращи ГИТ

- 4.6.1. Устойчивост в условия на симулиран стомашен сок. Устойчивост към рН 2,5 и 0,3% пепсин
- 4.6.2. Устойчивост в условия на симулиран чревен сок. Устойчивост към 0,3% жлъчни соли.
- 4.6.3. Антибактериална активност
- 4.6.4. Киселинообразуване на млечнокиселите бактерии, влизащи в състава на пробиотика Лактина
- 4.6.5. Чувствителност към антибиотици
- 4.6.6. Оценка на адхезионната способност на щамовете от пробиотичната добавка Лактина към HT-29 клетъчна линия
- 4.6.7. Оценка на повърхностната клетъчна хидрофобност (MATH метод) на МКБ

4.7. Генетична стабилност на щамовете

4.8. Изследване на *E. faecium* NBIMCC 8270 за наличие на гени за вирулентност

4.4. Количествен анализ на млечнокиселите бактерии в пробиотика

4.9. Стабилност на щамовете по време на съхранение в премикси и фуражи

4.10. Биологични опити с животни

- 4.10.1. Опити със зайци
- 4.10.2. Опити с пилета-бройлери

4.11. Изследване за намаляване на отделянето на Шига токсин продуциращ щам *E. coli* non-O157 STEC при овце

III. Резултати и дискусия

1. Характеристика на щамовете, влизащи в състава на добавка Лактина

Щамовете, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина са изолирани от домашно приготвени млечни продукти (*L. helveticus* NBIMCC 8269 от сирене, *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 от кисело мляко в Рила планина, *L. lactis* NBIMCC 8764 от кашкавал в района на Силистра), плодове като пъпеш в района на Хасково (*L. acidophilus* NBIMCC 8242), от мляко (*E. faecium* NBIMCC 8270) от 1989 до 2002 година.

Съхранението и поддържането на щамовете е осъществявано при -60°C в присъствие на криопротектор от 10% захароза, а под формата на лиофилизирани култури - при -18°C.

Преди стартирането на експерименталната работа по настоящия дисертационен труд бяха проверени някои техни фенотипни характеристики, с оглед потвърждаване на

тяхната видова принадлежност, за да бъдат избегнати последствия от настъпили промени в хода на тяхното съхранение.

Фенотипната характеристика на шестте щама включваше наблюдения на морфологията на колонииите и определяне на някои физиолого-биохимични свойства като растеж в основни среди, биологична активност и преживяемост, въглехидратен и ензимен метаболизъм като те бяха използвани и за целите на потвърждаване на тяхната видова принадлежност.

1.1. Морфологична характеристика

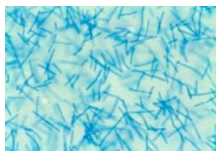
Морфологичната характеристика включва наблюдения на морфологията на колонииите и клетките на щамовете. Наблюдава се вариация в размера на колонииите при различните видове (Табл. 2). По отношение на морфологията на клетките не са наблюдавани големи различия сравнявайки коки с коки и пръчки с пръчки (Фиг. 1).

Таблица 2. Растеж на млечнокиселите бактерии в основни среди за тяхното култивиране

Щам	Хранителна среда	Морфология на клетки / колонии	Растеж
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	MRS бульон	Правилни средно дълги и дълги пръчки, главно поединично	Растеж (++) , утайка (++) , бистър бульон 24 ч при 37°C, pH-4.51 5 дни при 37°C
	MRS агар	-	Плътен гладък коагулум;
	Обезмаслено мляко (10 %)	Правилни средно дълги и дълги пръчки, главно поединично	pH (24 h)-3,54
	MRS агар	Груби колонии, по-малко с гладка форма	2–3 дни при 37°C, анаеробен
	Rogosa агар	Паяжиновидни, нишковидни, по-малко колонии с гладка повърхност	2–3 дни при 37°C, анаеробен
	PCA агар	Паяжиновидни и с гладка повърхност колонии	3 дни при 37°C, анаеробен
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	MRS бульон	Правилни средно дълги, дълги пръчки, главно поединично	Растеж (++) , утайка (++) , равномерно помътняване на бульона 24 h (37°C0 pH-4.31 5 дни / 37°C
	MRS агар	Малки, кремави, паяжиновидни колонии	
	Обезмаслено мляко (10 %)	Няма данни	Плътен гладък коагулум; pH (24 h)-3.80
	Eiliker бульон	Пръчици	Интензивен, със седимент 18 h при 37°C, микроаерофилен
	Обезмаслено мляко	Пръчици, еднородни	16 h при 37°C, микроаерофилен
	MRS агар	Груби колонии, по-малко с гладка форма	2 – 3 дни при 37°C, анаеробен
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	Rogosa агар	Груби колонии, по-малко с гладка форма	2 – 3 дни при 37°C, анаеробен
	PCA агар	Паяжиновидни колонии и с гладка повърхност	2 – 3 дни при 37°C, анаеробен
	MRS бульон	Средно дълги до дълги пръчки, склонни да се извиват, главно поединично	Растеж (++) , утайка (++) , слабо помътняване на бульона, 24 h/ 37°C/ pH-4.39 5 дни /37°C
	MRS агар	Памукообразни R-колонии, порядко S-колонии.	
	Обезмаслено мляко (10%)	Средно дълги до дълги пръчки, главно поединично Не са склонни към натрупване на волутин	Плътен гладък коагулум, pH (24 h)-3.60
	Eiliker бульон	По-дълги пръчици с волутинови гранули	Интензивен, със седимент 18 h при 37°C, микроаерофилен
Обезмаслено мляко	Пръчици със среден размер, еднородни, наблюдават се волутинови гранули при по-стари култури	16 h при 37°C, микроаерофилен	

Щам	Хранителна среда	Морфология на клетки / колонии	Растеж
	MRS агар	Памукообразни колонии, помалко с гладка форма	2 – 3 дни при 37°C анаеробен
	Rogosa агар	Памукообразни колонии, помалко с гладка форма	2 – 3 дни при 37°C анаеробен
	PCA агар	Паяжиновидни и с гладка повърхност	2 – 3 дни при 37°C анаеробен
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8764	MRS бульон	Правилни пръчки, къси до средно дълги, главно поединично, склонни към натрупване на волутин	Растеж (++) , утайка (++) , бистър бульон с постенен растеж, 24 h/ 37°C/ рН-4.25
	MRS агар	Малки, кремави, паяжиновидни колонии	5 дни / 37°C
<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	Обезмаслено мляко (10 %)	Няма данни	Плътен гладък коагулум; рН (24 h)-3.86
	M17 бульон	Клетките са главно поединично разположени	Растеж (+), утайка (+), плътна, равномерно помътняване на бульона 24 h/ 37°C/ рН 4.4 5 дни/ 37°C
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	M17 агар	Малки, матови, хомогенни колонии	
	Обезмаслено мляко (10 %)	Клетки, разположени по двойки и в къси верижки	Гладък коагулум; рН 4.52 (след 24 h) 2 – 3 дни при 37-42°C анаеробно, ако се добави дрождев екстракт, утайка с равномерно помътняване на бульона
	МПБ	Къси верижки от сферични клетки	2 – 3 дни/ 37-42°C аеробно
	PCA агар	Гладка повърхност на колоните	

Максимален растеж: (+ +); Нормален растеж: (+); Слаб растеж: (+/-) и липса на растеж: (-/-).



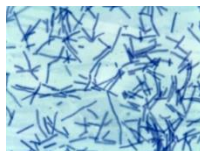
L. acidophilus NBIMCC 8242



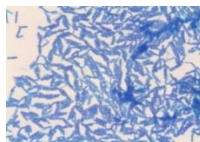
L. bulgaricus NBIMCC 8244



S. thermophilus NBIMCC 8253



L. helveticus NBIMCC 8269



L. lactis NBIMCC 8764



E. faecium NBIMCC 8270

Фигура 1. Морфология на клетките на различните щамове

1.2. Физиолого-биохимична характеристика

Потвърдена е реакцията на щамовете към оцветяването по Грам, като всички те са Грам-положителни. Всички щамове са каталазо-отрицателни. Проверена е и способността им към растеж при 15 и 45°C, да формират CO₂ при ферментиране на глюкоза, на амоняк от аргинин, растеж при рН 9.2 и растеж при рН 9.6. Резултатите от тези анализи са представени в Табл. 3. Щамовете не се различават помежду си по тези свойства с изключение на *L. acidophilus* NBIMCC 8242, който не показва растеж при рН 9.2.

Таблица 3. Основни физиолого-биохимични характеристики на щамовете

Характеристики	<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	<i>L. lactis</i> NBIMCC 8764	<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270
Оцветяване по Грам	+	+	+	+	+	+
Каталаза	-	-	-	-	-	-
Растеж при 45°C	+	+	+	+	+	+
Растеж при 15°C	-	-	-	-	-	-
Отделяне на CO ₂ от глюкоза	-	-	-	-	-	-
Отделяне на амоняк от аргинин	-	-	-	-	-	-
Растеж при рН 9.2	-	+	+	+	+	+
Растеж при рН 9.6	-	-	-	-	-	-

Освен изброените по-горе характеристики щамовете са характеризирани по степента на киселинообразуване, съотношение на D- и L- млечна киселина. Установено е, че крайното рН на средата в резултат на протичане на ферментация е около 4, като за видовете с пръчковидна форма на клетките то е малко по-ниско в сравнение с представителите на коковидните форми. Всички щамове натрупват преобладаващо D-млечна киселина, а оптично активната млечна киселина е в диапазона на 76 -91% (Табл. 4).

Таблица 4. Основни биохимични свойства на щамовете от пробиотичната добавка Лактина

Щам	h	рН	°Т	ОМ К*	ОАМК**	DL	% от ОМК*
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	16	4.3	88	0.80	0.69	0.46 D/- 0.23 L+	86.2
	48	3.4	215	1.94	1.74	1.31 D/- 0.43 L+	89.7
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	16	4.2	90	0.80	0.71	0.50 D/- 0.21 L+	88.7
	48	3.45	222	2.00	1.83	1.31 D/- 0.43 L+	91.5
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	6	4.6	60	0.54	0.36	0.34 D/- 0.02 L+	66.6
	48	3.7	195	1.76	1.34	1.30 D/- 0.04 L+	76.1
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8764	16	4.5	88	0.74	0.68	0.39 D/- 0.14 L+	86.6
	48	3.9	215	1.85	1.71	1.34 D/- 0.24 L+	76.1
<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	16	4.5	88	0.74	0.68	0.39 D/- 0.14 L+	88.2
	48	3.9	215	1.85	1.71	1.34 D/- 0.24 L+	78.4
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	16	4.5	88	0.74	0.68	0.45 D/- 0.15 L+	88.2
	48	3.9	206	1.85	1.71	1.34 D/- 0.24 L+	78.4

*ОМК (общо млечна киселина)

** ОАМК (оптично активна млечна киселина) –метод на Voeltinger

Характеризирането на щамовете включва и проследяване на тяхната биологичната активност. Локалното понижаване на рН от пробиотиците и произтичащото от това създаване на неблагоприятни условия за растеж на патогени е един от възможните механизми на действие на тези микроорганизми. Ето защо изследването на способността за киселинообразуване е един от критериите за селекция на пробиотични щамове. Резултати от това изследване са представени в Табл. 5.

Таблица 5. Биологична активност и преживяемост на щамовете МКБ от добавката Лактина в процеса на лиофилизация

Вид	Киселинообразуване*		Леофилизация**		Преживяемост, %
	в мляко рН /°Т/ 24h	в бульон* рН/ 24h	CFU /ml MRS/Мляко	CFU /g MRS/Мляко	
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	4.22/ 108°Т	3,76/149°	4.5 x 10 ⁸	4.5 x 10 ⁸	12.5
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	3.66/ 138°Т	3,90/137°	2.5 x 10 ⁸	7.5 x 10 ⁸	37.5
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	3.63/ 143°Т	3,88/140°	6.2 x 10 ⁸	9.1 x 10 ⁸	18.3
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8764	4.04/ 122°Т	4.10/120°	2.3 x 10 ⁸	4.8 x 10 ⁸	26.1
<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	4.54/ 98°Т	4.48/84°	2.5 x 10 ⁸	4.0 x 10 ⁸	20.0
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	3.94/ 129°Т	4.37/92°	7.0 x 10 ⁸	7.3 x 10 ⁸	45.5

Определен е ферментационният профил на щамовете чрез използването на API 50 CH. В Табл. 6 са представени данните от този анализ. Сравняването на метаболитните профили на изолатите разкрива известни различия в процента на щамовете, усвояващи едни или други субстрати, но разликите не са съществени. Анализът на резултатите показва, че за 90% от щамовете е характерно усвояване на лактоза, галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-маноза. Целобиоза, малтоза, мелибиоза, захароза, трехалоза се усвояват само от част от щамовете.

Чрез използването на кит API ZYM щамовете, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина са характеризирани по набор от 19 ензимни активности. Резултатите са отразени в Табл. 7-11. Анализът на получените данни показва, че между щамовете се наблюдават вариации, но за всички е характерно синтезирането на β -galactosidase, leucine arylamidase, esterase и cystine arylamidase, в по-малка степен valine arylamidase, lipase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase и phosphatase acid. Получените от нас резултати за ензимния профил на щамовете е в съответствие с стойностите, получени за съответстващите референтни щамове (Табл. 7, 8, 9 и 10).

Таблица 6. Ферментационен профил на шамовете, определен чрез API 50 CH

№	Субстрат	Образуване на киселина на 24/48 h при щам:					
		<i>La</i>	<i>Lh</i>	<i>Lb</i>	<i>Li</i>	<i>St</i>	<i>Ef</i>
0	Контрола	-	-	-	-	-	-
1	Глицерин	-	-	-	-	-	-
2	Еритрол	-	-	-	-	-	-
3	D-арабиноза	-	-	-	-	-	-
4	L- арабиноза	-	-	-	-	-	+
5	Рибоза	-	-	-	-	-	+
6	D-ксилоза	-	-	-	-	-	-
7	L- ксилоза	-	-	-	-	-	-
8	Адонитол	-	-	-	-	-	-
9	β-метил-ксилозид	-	-	-	-	-	-
10	Галактоза	24 h +	24 h +	-	+	-	24 h /48h +
11	D-глюкоза	24 h +	24 h +	18 h +	+	24 h +48h+	24 h /48h +
12	D-фруктоза	24 h +	-	24 h +	+	-	24 h /48h +
13	D-маноза	48 h +	24 h +	48 h +	+	-	24 h /48h +
14	L-сорбоза	-	-	-	-	-	-
15	Рамноза	-	-	-	-	-	-
16	Дулцитол	-	-	-	-	-	-
17	Инозитол	-	-	-	-	-	-
18	Манитол	-	-	-	-	-	24 h /48h +
19	Сорбитол	-	-	-	-	-	-
20	α-метил-D-манозид	-	-	-	-	-	-
21	α-метил-D-глюкозид	-	-	-	-	-	-
22	N-ацетил глюкозамин	24 h +	24 h +	-	-	-	24 h /48h +
23	Амигдалин	-	-	-	-	-	24 h /48h +
24	Арбутин	-	-	-	-	-	24 h /48h +
25	Ескулин	-	-	-	-	-	24 h /48h +
26	Салицин	-	-	-	-	-	24 h /48h +
27	Целоброза	24 h +	-	-	-	-	24 h /48h +
28	Малтоза	24 h +	-	-	+	-	24 h /48h +
29	Лактоза	18 h +	18 h +	18 h +	+	24 h +48h+	24 h /48h +
30	Мелибиоза	48 h +	-	-	-	-	24 h /48h +
31	Захароза	72 h +	-	-	+	24 h +48h+	24 h /48h +
32	Трехалоза	72 h +	-	-	+	-	24 h /48h +
33	Инулин	-	-	-	-	-	-
34	Мелезитоза	-	-	-	-	-	-
35	D-рафиноза	-	-	-	-	-	-
36	Скорбяла	-	-	-	-	-	24 h /48h +
37	Гликоген	-	-	-	-	-	24 h /48h +
38	Ксилитол	-	-	-	-	-	-
39	β-гентобиоза	-	-	-	-	-	24 h /48h +
40	D-тураноза	-	-	-	-	-	-
41	D-ликсоза	-	-	-	-	-	-
42	D-тагатоza	-	-	-	-	-	-
43	D-фуккоза	-	-	-	-	-	-
44	L-фуккоза	-	-	-	-	-	-
45	D-арабитол	-	-	-	-	-	-
46	L-арабитол	-	-	-	-	-	-
47	Глюконат	-	-	-	-	-	-
48	2-кето глюконат	-	-	-	-	-	-

№	Субстрат	Образуване на киселина на 24/48 h при щам:					
		<i>La</i>	<i>Lh</i>	<i>Lb</i>	<i>Li</i>	<i>St</i>	<i>Ef</i>
49	5-кето глюконат	-	-	-	-	-	-

La – *L. acidophilus* NBIMCC 8242; *Lh* – *L. helveticus* NBIMCC 8269; *Lb* – *L. bulgaricus* NBIMCC 8244; *Li* – *L. lactis* NBIMCC 8764; *St* – *S. thermophilus* NBIMCC 8253; *Ef* – *E. faecium* NBIMCC 8270.

Таблица 7. Ензимна активност на *L. acidophilus* NBIMCC 8242 (API ZYM bioMérieux)

№	Ензим	<i>L. acidophilus</i>	
		NBIMCC 8242	Типов щам ATCC 4356
1	Контрола	-	-
2	Phosphatase	-	-
3	Esterase (C 4)	1+	+
4	Esterase Lipase (C 8)	1+	+
5	Lipase (C 14)	1+	+
6	Leucine arylamidase	5+	+
7	Valine arylamidase	3+	+
8	Cystine arylamidase	5+	+
9	Trypsin	-	-
10	Chomotrypsine	-	-
11	Phosphatase acid	1+	+
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	2+	+
13	A-Galactosidase	5-	-
14	β -Galactosidase	5+	5+
15	β -Glucuronidase	-	-
16	α - Glucosidase	-	-
17	β -glucosidase	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
19	α -Mannosidase	-	-
20	α -Fucosidase	-	-

Таблица 8. Ензимна активност на *L. helveticus* NBIMCC 8269 (API ZYM bioMérieux)

№	Ензим	<i>L. helveticus</i>	
		NBIMCC 8269	Типов щам ATCC 5009
1	Контрола	-	-
2	Phosphatase	-	-
3	Esterase (C 4)	+	+
4	Esterase Lipase (C 8)	1+	+
5	Lipase (C 14)	+	+
6	Leucine arylamidase	3+	+
7	Valine arylamidase	2+	+
8	Cystine arylamidase	3+	+
9	Trypsin	-	-
10	Chomotrypsine	-	-
11	Phosphatase acid	1+	+
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3+	+
13	A-Galactosidase	-	-
14	β -Galactosidase	5+	5+
15	β -Glucuronidase	-	-
16	α - Glucosidase	-	-
17	β -glucosidase	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
19	α -Mannosidase	-	-
20	α -Fucosidase	-	-

Таблица 9. Ензимна активност на *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 (API ZYM bioMérieux)

№	Ензим	<i>L. bulgaricus</i>	
		NBIMCC 8244	Типов щам ATCC 1842
1	Контрола	-	-
2	Phosphatase	-	-
3	Esterase (C 4)	+	+
4	Esterase Lipase (C 8)	1+	+
5	Lipase (C 14)	+	+
6	Leucine arylamidase	5+	2+
7	Valine arylamidase	2+	+
8	Cystine arylamidase	2+	+
9	Trypsin	-	-
10	Chomotrypsine	-	-
11	Phosphatase acid	1+	+
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	2+	+
13	A-Galactosidase	-	-
14	β -Galactosidase	5+	5+
15	β -Glucuronidase	-	-
16	α - Glucosidase	-	-
17	β -glucosidase	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
19	α -Mannosidase	-	-
20	α -Fucosidase	-	-

Таблица 10. Ензимна активност на щам *L. lactis* NBIMCC 8764 (API ZYM bioMérieux)

№	Ензим	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactic</i>	
		NBIMCC 8764	Типов щам ATCC 1231
1	Контрола	-	-
2	Phosphatase	-	-
3	Esterase (C 4)	+	+
4	Esterase Lipase (C 8)	+	+
5	Lipase (C 14)	+	+
6	Leucine arylamidase	5+	+
7	Valine arylamidase	3+	+
8	Cystine arylamidase	4+	+
9	Trypsin	-	-
10	Chomotrypsine	-	-
11	Phosphatase acid	2+	+
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	2+	+
13	A-Galactosidase	-	-
14	β -Galactosidase	5+	5 +
15	β -Glucuronidase	-	-
16	α - Glucosidase	-	-
17	β -glucosidase	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
19	α -Mannosidase	-	-
20	α -Fucosidase	-	-

Таблица 11. Ензимна активност на щам *S. thermophilus* NBIMCC 8253 и *E. faecium* NBIMCC 8270 (API ZYM bioMérieux)

№	Ензим	Активност	
		<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>
1	Контрол	-	-
2	Phosphatase	3+	5+
3	Esterase (C 4)	3+	3+
4	Esterase Lipase (C 8)	4+	2+
5	Lipase (C 14)	-	-
6	Leucine arylamidase	3+	3+
7	Valine arylamidase	-	-
8	Cystine arylamidase	4+	4+
9	Trypsin	-	-
10	Chomotrypsine	3+	-
11	Phosphatase acid	5+	5+
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	5+	5+
13	A-Galactosidase	-	-
14	β -Galactosidase	5+	1+
15	β -Glucuronidase	-	-
16	α - Glucosidase	-	-
17	β -glucosidase	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
19	α -Mannosidase	-	-
20	α -Fucosidase	-	-

1.3. Потвърждаване на видовата принадлежност на щамове, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина

Китовете API 50 CH се използват като за характеризирани на ферментационния профил на млечнокиселите бактерии, така и за видова идентификация на неизвестни култури при сравняването на техния профил с профила на референтни щамове. В нашия случай ние използвахме този тест и за да потвърдим или отхвърлим видовата принадлежност на щамове, влизащи в състава на пробиотичната добавка. Сравняването на ферментационните профили на нашите щамове с тези на използваните в изследването референтни култури или с базата данни, използвайки софтуера *apiweb stand alone V 1.2.1* потвърди видовата принадлежност и на шестте щамове, а резултатите са дадени в Табл. 12.

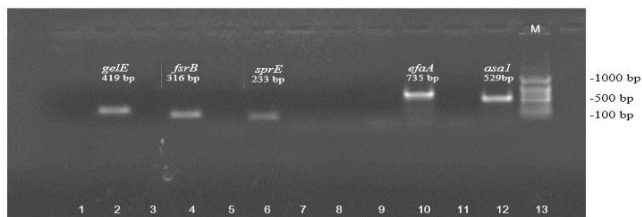
Таблица 12. Резултати от идентификацията на щамовете с API 50 CH

Щам	Идентификация, % вероятност
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	98.6 %
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	86.6 %
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	98.8 %
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8764	83.8 %
<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	99.2 %
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	92.8 %

2. Изследване на *E. faecium* NBIMCC 8270 за наличие на вирулентни гени в неговия геном

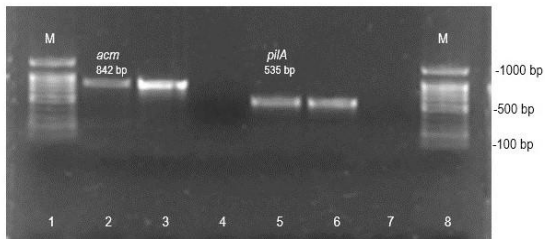
Наличието на вирулентни гени в генома на *E. faecium* NBIMCC 8270 е изследвано чрез PCR-амплификация със специфични праймери за наличието на 9 гени, които кодират синтезирането на вирулентни фактори – *sprE*, *fsrB*, *asa1*, *efaA*, *gelA*, *esp*, *act*, *pilA* и *pilB*. Като контроли в изследването са използвани *E. faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekk319), съдържащ *VanB* и повечето от известните ентерококови вирулентни гени и *E. faecium* щам L-3, пробиотичен щам, носещ *entA*, *entB*, *act*, *pilA*, *pilB* гени в своя геном. Изследваният от нас щам *E. faecium* NBIMCC 8270 не притежава гените за желатиназа (*gelE*), серин протеиназа (*sprE*), *fcr* и предполагаеми фактори *asa1*, *efaA*, *esp* (Фиг. 6), както и *pilB* гени, но носи *pilA* и *act* (Фиг. 3 и 4).

Представителите на род *Enterococcus* са нормални обитатели на чревния тракт на човека и са с дълга история като стартерни култури за получаване на ферментирани храни. Те се използват при производството на ферментирани меса, зеленчуци и най-вече мляко за получаване на различни храни, предимно сирена (Moreno *et al.*, 2001). Казаното по-горе ни дава основание да направим заключение, че генният профил на *E. faecium* NBIMCC 8270, според информацията в научната литература, го определя като безопасен и годен за използване като пробиотик при животни.



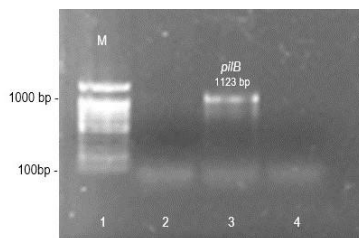
Фигура 2. PCR-амплификация с праймери, специфични за гени при ентерококи

1-*E. faecium* NBIMCC 8270 *gelE* (очакван размер 419 bp);2-*E. faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekk319), *gelE* +3-*E. faecium* NBIMCC 8270 *sprE* (очакван размер 233 bp);4-*E. faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekk319), *sprE* +5-*E. faecium* NBIMCC 8270 *fsrB* (очакван размер 316 bp);6-*E. faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekk319), *fsrB* +7-*E. faecium* NBIMCC 8270 *esp* (очакван размер 933 bp);8-*E. faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekk319), *esp*;9-*E. faecium* NBIMCC 8270 *efaA* (очакван размер 735 bp);10-*E. faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekk319), *efaA* +11-*E. faecium* NBIMCC 8270 *asa1* (очакван размер 529 bp);12-*E. faecalis* CCUG 52538 (SMI Ekk319), *asa1* +;13-ДНК-маркер, 100-1000, 1500 bp



Фигура 3. PCR-амплификация с праймери, специфични за на *ast* и *pilA* гените при ентерококи

1- 8-ДНК-маркер, 100-1000, 1500 bp; 2- *E. faecium* NBIMCC 8270 *ast* (очакван размер 842 bp) + 3- *E. faecium* L3 *ast* + 4-отрицателна контрола за *ast*; 5- *E. faecium* NBIMCC 8270 *pilA* (очакван размер 535 bp) + 6- *E. faecium* L3 *pilA* + 7-отрицателна контрола *pilA*



Фигура 4. PCR-амплификация с праймери, специфични за *pilB* гените при ентерококи

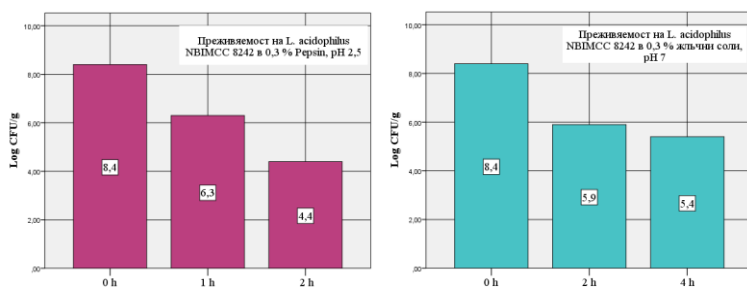
1- ДНК-маркер, 100-1000, 1500 bp; 2- *E. faecium* NBIMCC 8270 *pilB* (очакван размер 1123 bp); 3- *E. faecium* L3 *pilB* + 4-отрицателна контрола *pilB*

3. *In vitro* оценка на основните функционални характеристики на щамовете от пробиотичната добавка Лактина

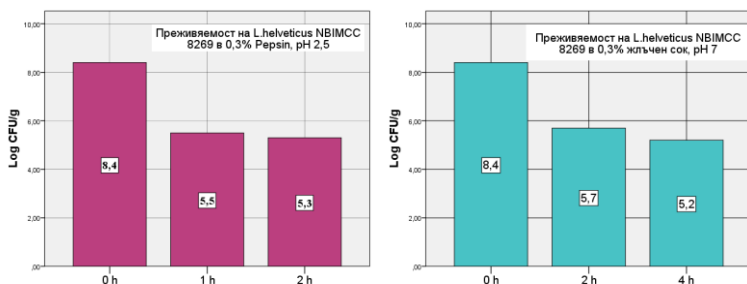
3.1. Оценка на транзитната толерантност на лиофилизирани култури в условия, симулиращи гастро-интестиналния тракт (ГИТ)

МКБ са подложени на оценка със създаден динамичен модел на пасаж в ГИТ, който симулира цялостното преминаване на пробиотика през него. На всеки етап е отчетена промяната в броя на живите клетки, които доказват способността на щамовете да оцеляват при неблагоприятни условия. В резултат на проведените анализи на шестте

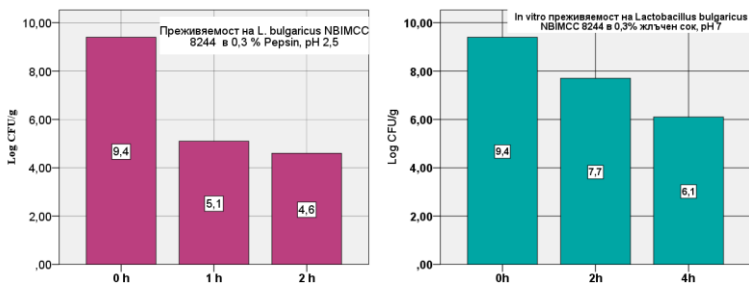
щамата е установена добра поносимост към жлъчни соли и пепсин. Анализът на данните показва, че *S. thermophilus* NBIMCC 8253 и *E. faecium* NBIMCC 8270 имат най-висока устойчивост, подложени за два часа на действието на пепсин (рН 2,5), докато лактобацилите имат по-ниска преживяемост (Фиг. 5-10). Сравнявайки оцеляването на щамите по отношение на престой в жлъчни соли за 4 h се вижда, че отново с изключение на *S. thermophilus* NBIMCC 8253 и *E. faecium* NBIMCC 8270, другите щамове са по-малко резистентни към такива условия. Докато двата щамове с коковидна форма на клетките достигат преживяемост от около 10%, останалите показват стойност на преживяемостта си под 1%, съответно за 2 или 4 h (Табл. 13). Частично съвпадение на нашите резултати по отношение на преживяемостта на кожите се установява с изследването на Uriot *et al.* (2016). Резултатите показват, че с увеличаване на продължителността на инкубация при рН 2,5 растежът на всички щамове намалява, което се потвърждава от изследванията на Li *et al.* (2016).



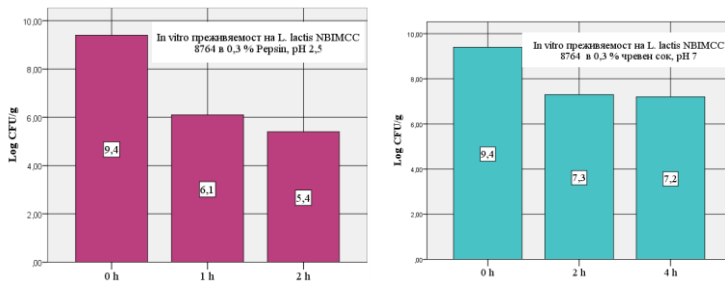
Фигура 5. *In vitro* преживяемост в условията на ГИТ на *L. acidophilus* NBIMCC 8242 в 0,3% пепсин, рН 2.5 и в 0,3% жлъчни соли, рН 7.



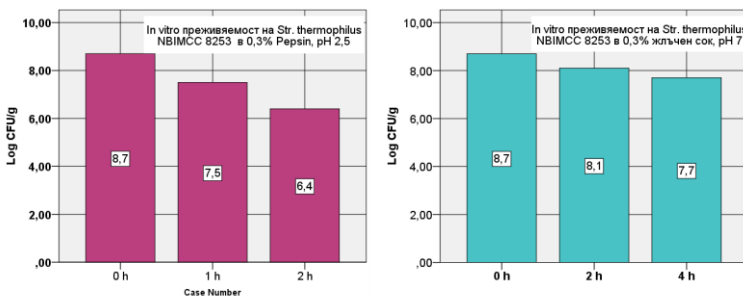
Фигура 6. *In vitro* преживяемост в условията на ГИТ на *L. helveticus* NBIMCC 8269 в 0,3% пепсин и жлъчни соли.



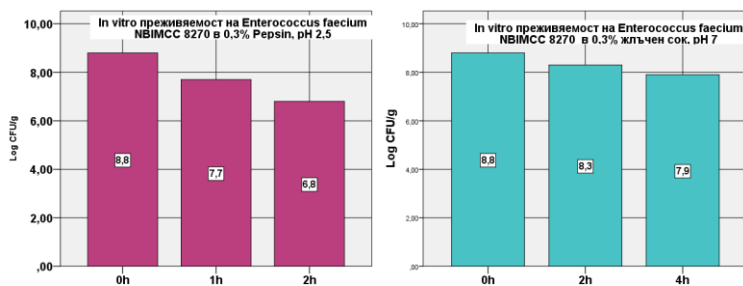
Фигура 7. *In vitro* преживяемост в условията на ГИТ на *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 в 0,3% пепсин и в 0,3% жлъчни соли.



Фигура 8. *In vitro* преживяемост в условията на ГИТ на *L. lactis* NBIMCC 8764 в 0,3% пепсин и в 0,3% жлъчни соли (pH 7).



Фигура 9. *In vitro* преживяемост в условията на ГИТ на *S. thermophilus* NBIMCC 8253 в 0,3% пепсин (pH 2.5) и червен сок (pH 7).



Фигура 10. *In vitro* преживяемост в условията на ГИТ на *E. faecium* NBIMCC 8270 в 0,3% пепсин (pH 2.5) и червен сок (pH 7).

Таблица 13. *In vitro* преживяемост (%) в условията на ГИТ на щамовете МКБ, влизаци в състава на пробиотична добавка Лактина

Микроорганизъм	Моделна система / преживяемост (%)			
	0,3 % пепсин, pH 2.5 (2 h)		0.3 % Oxgall, pH 7.0 (4 h)	
	%	% (log CFU)	%	% (log CFU)
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	0,08	63	0,06	62
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	0,06	62	0,06	62
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	0,002	49	0,056	64,9
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8764	0,01	57,4	0,64	76,6
<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	0,27	74,8	8,8	87
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	0,72	74	8,8	87,5

Толерантността към ниското рН и жлъчни соли е не само важна за преживяемостта на бактериите към условията на стомашно-чревния тракт, но и за тяхното използване като хранителни и фуражни добавки (Handa and Sharma, 2016). Това определя *in vitro* преживяемостта като важна характеристика за признаването на един щам като пробиотик.

3.2. Определяне на адхезионни характеристики и способност към трайна колонизация в ГИТ на млечнокиселите бактерии от добавката

3.2.1. Адхезионна способност на млечнокиселите бактерии

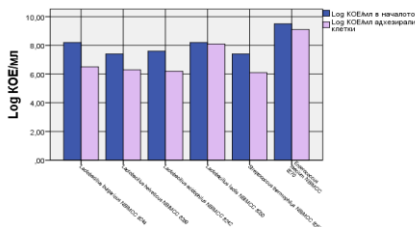
Всеки пробиотичен щам, който успешно премине бариерите на ГИТ, достига дебелото черво и в зависимост от щамовете характеристики може да преживее за определен период или да колонизира епителните повърхности, превръщайки се в част от постоянната микрофлора на ГИТ. За тази цел адхезията към човешки

епителни клетки е оценена по две методики: количествено (определяне процента на адхезирали клетки) и качествено (микроскопска оценка). (Diary *et al.*, 2011): (1) слабо адхезиращи - (между 0.18 – 0.82% адхезия); (2) от умерено до добре адхезиращи (между 1.38 – 9.04% адхезия) и (3) - от високо до много високо адхезиращи (между 10.0 – 75.4% адхезия (Табл. 14 и 15 и Фиг. 15).

Щамове се групират в две групи. Първата група обединява умерено до добре адхезиращи се щамове, към която се отнасят *S. thermophilus* NBIMCC 8253, *L. bulgaricus* NBIMCC 8244, *L. acidophilus* NBIMCC 8242 и *L. helveticus* NBIMCC 8269. Втората група включва щамове с висока степен на адхезия, в която попадат *L. lactis* NBIMCC 8250 и *E. faecium* NBIMCC 8270. Качествената оценка дава визуална представа за броя на адхезиралите клетки (Фиг. 11 и 12). Наблюдава се добра корелация между качествения и количествения метод.

Таблица 14. Количествена оценка на адхезионната способност на щамове млечнокисели бактерии и бифидобактерии към човешка клетъчна линия HT-29

Щам	CFU/ml (начало)	CFU/ml (края)	Адхезия, %	Намаляване на адхезията (log)	Хидрофобност, %
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	1.88 x10 ⁸	5.05 x10 ⁶	2.69	1.60	13.3
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	4.33 x10 ⁷	3.15 x10 ⁶	7.27	1.14	11.8
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	5.95 x10 ⁷	2.00 x10 ⁶	3.36	1.47	7.8
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8250	1.69 x10 ⁸	1.10 x10 ⁸	65	0.19	5.14
<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	3.82 x10 ⁷	1.02 x10 ⁶	2.67	1.57	6.94
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	5.00 x10 ⁹	1.15 x10 ⁹	23	1.17	11.7
<i>L. casei shirota</i> референтен щам	не е изследвано	не е изследвано	3.79		0.3
<i>L. rhamnosus</i> GG референтен щам	не е изследвано	не е изследвано	55.20		22.4

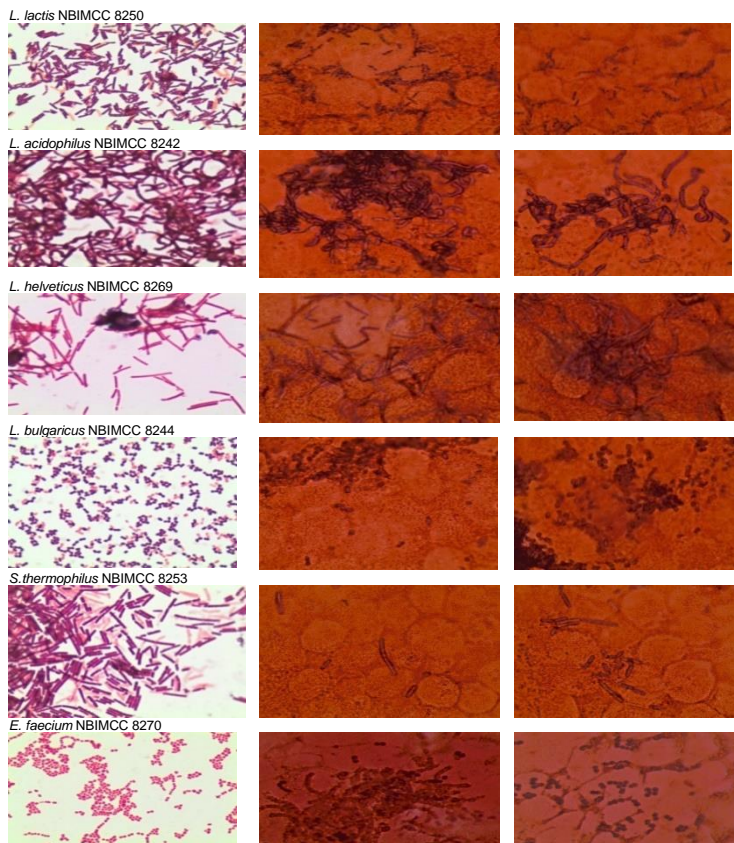


Фигура 11. Графично представяне на адхезионната способност на щамове, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина към човешка клетъчна линия HT-29.

Таблица 15 Качествена оценка на микробната адхезия към човешка клетъчна линия HT-29

Щам	Адхезия*
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	++
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	+++
<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	+++
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	+++
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8250	++++
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	++++

*++ - слаба адхезия; +++ - умерена адхезия; ++++ - висока адхезия

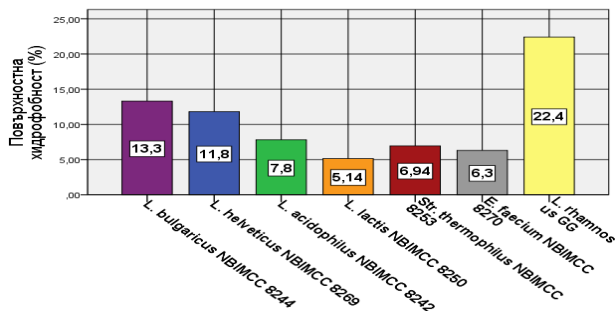


Фигура 12. Адхезионна способност на щамовете МКБ, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина към HT-29 клетъчна линия.

3.2.2. Повърхностна клетъчна хидрофобност на млечнокиселите бактерии

За оценка на хидрофобния потенциал на щамовете млечнокисели бактерии, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина в настоящето проучване са използвани два метода: оценка на бактериалната повърхностна хидрофобност (Н%) използвайки хексадекан и оценка на адхезията към човешка ракова клетъчна линия HT-29 (вж. т. 5.3.2.). Двамата метода са широко използвани и общопризнати, като не един път е дискутирана корелацията, която съществува между тях (Li *et al.*, 2014).

Въз основа на получените резултати с метода на бактериална адхезия към въглехидрати (MATH) тестваните щамове демонстрират по-скоро слаба повърхностна хидрофобност - *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 и *L. helveticus* NBIMCC 8269 (със стойности над 10%) и по-скоро хидрофилни щамове (т.е. с ниска повърхностна хидрофобност) - *L. acidophilus* NBIMCC 8242, *L. lactis* NBIMCC 8250 и *Str. thermophilus* NBIMCC 8253 (Фиг. 13). Сравнението с референтния щам *L. rhamnosus* GG потвърждава наблюденията за ниско привличане на молекулите на бактериалните повърхности и епителните клетки.



Фигура 13. Повърхностна клетъчна хидрофобност (Н, %) на щамовете млечнокисели бактерии, влизащи в пробиотична добавка Лактина и нейното сравнение с тази при референтни щамове *L. casei shirota* и *L. rhamnosus* GG.

MATH - използва се за оценка на неспецифичните хидрофобни взаимодействия в бактериалната адхезия към клетъчни повърхности. $H\% = (1 - A_i/A_0) \times 100$

Получените стойности на хидрофобността на шестте млечнокисели бактерии е в интервала от 5,14 до 13,3. Щам *L. lactis* NBIMCC 8250 показва най-ниска стойност на

задържане на п-хескадекан, което е израз на ниска хидрофобност, докато щам *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 показва най-висока хидрофобност. От всички изследвани щамове единствено *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 и *L. helveticus* NBIMCC 8269 демонстрират стойности над 10%. Въз основа на това можем да заключим, че изследваните от нас щамове притежават от слаба до средна хидрофобност, която по всяка вероятност оказва влияние върху способността за придържане към епителни клетки.

3.3. Антимикробна активност на МКВ, компоненти на пробиотичната добавка Лактина

Антибактериалната активност е важна част от основните характеристики на бактерии, подлежащи на селектиране за използване като пробиотици. Способността към продуциране на бактериоцини на изследваните от нас щамове МКВ по отношение на Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми като *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* и дрожди *C. albicans* е тествана по метода на ямките в различни хранителни среди, след изключване на инхибиторния ефект, дължащ се на производството на органични киселини. Резултатите са представени в Табл. 30-32. Вижда се, че никой от щамовете не притежава потенциал да инхибира растежа на *B. cereus* и *C. albicans*, въпреки че преди неутрализация съществува инхибиторна зона (при *B. cereus*), която се дължи най-вероятно на отделянето на *органични* киселини. За да се отхвърли ефекта от действието на органичните киселини е изследвана антимикробната активност на неутрализираната супернатанта. Липсата на активност срещу някои от тестовите микроорганизми, показва, че инхибирането се дължи на производството на органични киселини. Запазването на антимикробна активност дори и след неутрализация на безклетъните супернатанти вероятно се дължи на вещества, различни от органичните киселини (напр. антимикробни пептиди), които действат синергично, за което обаче са необходими допълнителни изследвания.

Щамовете, с изключение на *L. helveticus* NBIMCC 8269, не потискат растежа на Грам-отрицателния тест-микроорганизъм (*E. coli*) докато по отношение на *S. aureus* три от щамовете запазват антимикробната си активност и след неутрализиране на средата (*L. acidophilus*, *L. helveticus* и *L. lactis*) (Табл. 16 и 17). *L. acidophilus*, *L. helveticus* и *L. Lactis* проявяват най-висока инхибиторна активност, което е потвърждение на резултатите, получени от Nigam *et al.* (2015), които също установяват добра антагонистична активност на част от тези видове. Докладвани са също така случаи на щамове от род *Lactobacillus*, които потискат широк спектър от патогени, като напр. *Pseudomonas aeruginosa* (Jamalifar *et al.*, 2011). По отношение на *C. albicans* никой от тестваните щамове не притежава потенциал да потисне развитието на тази гъбичка, причинител на кандидоза, като

активността, която се отчита при кисела супернатанта вероятно се дължи на продукцията на органични киселини и/или H₂O₂

Таблица 16 Антимикробна активност на *L. acidophilus* NBIMCC 8242 и *L. helveticus* NBIMCC 8269 срещу потенциално патогенни микроорганизми, определена по метода на ямките

Хр. среда	pH	Инхибиторна зона, mm								pH
		<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242				<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269				
		S.a.	B. c.	E. c.	C.a.	S.a.	B. c.	E. c.	C.a.	
MRS (к)	4.51	22	17	20	0	17	15	17	0	4.31
MRS (н)	5.48	13 бс	0	0	0	12	0	12	0	5.50
COM (к)	3.54	23	23	24	0	20	22	20	0	3.53
COM (н)	5.55	0	0	0	0	0	0	0	0	5.49

S.a. – *S. aureus* NBIMCC 3703; B. c. – *B. cereus* NBIMCC 1085; E. c. – *E. coli* NBIMCC 3702;
C. a. – *C. albicans* NBIMCC 74; (к) – кисела; (н) – неутрализирана; инхибиторна зона ≥10 mm се счита за положителен резултат

Таблица 17 Антимикробна активност на *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 и *L. lactis* NBIMCC 8764 срещу потенциално патогенни микроорганизми, определена по метода на ямките

Хр. среда	pH	Инхибиторна зона, mm								pH
		<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244				<i>L. lactis</i> NBIMCC 8764				
		S.a.	B. c.	E. c.	C.a.	S.a.	B. c.	E. c.	C.a.	
MRS (к)	4.39	21	19	20	0	16	17	17	0	4.25
MRS (н)	5.35	0	0	0	0	106с	0	0	0	5.46
COM (к)	3.49	24	24	20	146с	16	18	17	0	3.74
COM (н)	5.60	0	0	0	0	0	0	0	0	5.55

S.a. – *S. aureus* NBIMCC 3703; B. c. – *B. cereus* NBIMCC 1085; E. c. – *E. coli* NBIMCC 3702;
C. a. – *C. albicans* NBIMCC 74; (к) – кисела; (н) – неутрализирана; бс – бактериостатична зона
инхибиторна зона ≥10 mm се счита за положителен резултат

Таблица 18 Антимикробна активност на *S. thermophilus* NBIMCC 8244 и *E. faecium* NBIMCC 8764 срещу потенциално патогенни микроорганизми, определена по метода на ямките

Хр. среда	pH	Инхибиторна зона, mm								pH
		<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253				<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270				
		S.a.	B. c.	E. c.	C.a.	S.a.	B. c.	E. c.	C.a.	
MRS (к)	4.25	15	15	16	0	19	14	18	0	4.25
MRS (н)	5.46	0	0	0	0	0	0	0	0	5.46
COM (к)	3.64	15	15	15	0	15	17	18	0	3.74
COM (н)	5.55	0	0	0	0	0	0	0	0	5.55

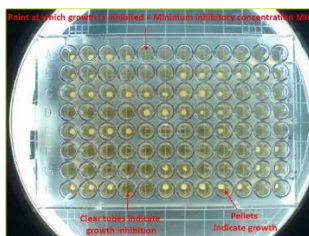
S.a. – *S. aureus* NBIMCC 3703; B. c. – *B. cereus* NBIMCC 1085; E. c. – *E. coli* NBIMCC 3702;
C. a. – *C. albicans* NBIMCC 74; (к) – кисела; (н) – неутрализирана; инхибиторна зона ≥10 mm се счита за положителен резултат

Обобщението на резултатите показва видова- и щамово-специфична способност за потискане на тест културите, като в същото време се наблюдават различия в спектъра

на потисканите микроорганизми при пробите с и без неутрализация на безклетъните супернатанти.

3.4. Чувствителност към антибиотици

Щамовете са характеризирани по отношение на чувствителността им към десет антибиотици от различни групи – ампицилин (бета-лактами), стрептомицин, гентамицин и канамицин (аминогликозиди), ванкомицин (гликопептид), еритромицин (макролиди), клиндамицин (линкозамиди), квинопристин+далфопристин (стрептограмини), тетрациклин (тетрациклини), хлорамфеникол (амфениколи). Резултатите от проучването показват, че щамовете *L. acidophilus* NBIMCC 8242, *L. helveticus* NBIMCC 8269, *L. bulgaricus* NBIMCC 8244, *L. lactis* NBIMCC 8250, *S. thermophilus* NBIMCC 8253 и *E. faecium* NBIMCC 8270 са чувствителни към антимикробни вещества, тъй като те се инхибират от концентрации на антибиотиците по-ниски или равни на критичните нива, определени от Европейската агенция по безопасност на храните (Фиг. 14).



Фигура 14. Плака с ямки за разреждане на бульон, който може да осигури качествен (чувствителни или резистентни) и количествен (минималната инхибираща концентрация (MIC) резултат.

Таблица 19 Антибиотична чувствителност на щамовете МКБ от състава на пробиотична добавка Лактина

Антибиотици	Минимална инхибираща концентрация, mg/L									
	A	V	G	Ka	S	E	Kd	T	C	Kv+Df
Гранични стойности mg/L	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
Щам										
<i>L. acidophilus</i> NBIMCC 8242	0.12	1	4	16	4	0.25	1	1	2	0.5
<i>L. helveticus</i> NBIMCC 8269	1	2	16	2	0.25	1	0.25	1	1	1
<i>L. lactis</i> NBIMCC 8250	0.06	1	16	16	16	0.25	0.12	0.5	2	0.5
Гранични стойности mg/L	2	4	32	64	64	2	2	4	4	4
<i>L. bulgaricus</i> NBIMCC 8244	0.12	0.5	16	32	32	2	0.25	0.25	4	0.5

<i>S. thermophilus</i> NBIMCC 8253	0.12	0.5	16	32	32	2	0.25	0.25	4	0.5
Гранични стойности mg/L	4	4	32	512	128	4	4	2	8	4
<i>E. faecium</i> NBIMCC 8270	2	4	32	32	2	2	2	2	2	2

A-ампицилин; V-ванкомицин; G-гентамицин; Ka-канамицин; S-стрептомицин; E-еритромицин; Kd-клиндамицин; T-тетрацилин; C-хлорамфеникол; Kv+Df-квинопристин+далфопристин

Целта на изследването е да се оцени чувствителността на шестте пробиотични щама към избрани антибиотици от различни групи, които биха могли да окажат влияние върху тяхното оцеляване в среда, съдържаща антимикробни вещества, както и да разкрие рискове от трансфер на детерминанти за антибиотична резистентност. Диференцирането на бактериалните щамове като устойчиви или чувствителни е възможно чрез използване на метода на определяне на минимални инхибиращи концентрации (MIC). Определянето на MIC към съответен набор от антимикробни средства е надежден тест, който може да се използва за предсказване на поведението на различни щамове млечнокисели бактерии към антибиотици по време на тяхното използване като пробиотични култури. Резултатите показват, че всички изследвани щамове от род *Lactobacillus* са чувствителни към набора от изследвани антибиотици, тъй като те се инхибират от концентрации на антибиотичите по-ниски или равни на критичните нива, определени от Европейската агенция по безопасност на храните (Табл. 19). Следователно необходима е допълнителна информация за генетичната основа на устойчивостта на тези щамове към посочените антибиотици, за да се избегнат потенциални рискове.

Настоящото проучване показва, че резистентността към антибиотици е видово и щамово специфична, трябва да бъде добре изследвана и да се разглежда като важна част при оценка на безопасността на пробиотичите при използването им като добавки към фуражите за животни.

4. Оценка на генетичната стабилност на пробиотичните щамове

Генетичната стабилност на щамовете е проверена като за целта са използвани култури от всеки щам, съхранявани при различни условия, описани в Табл. 20. Тя е оценена чрез PCR-RAPD анализ чрез използването на праймер M13V. Резултатите от този анализ за шестте щама илюстрират пълна идентичност на RAPD профилите, генерирани с праймер M13V, което доказва генетичната стабилност на тестваните култури.

Таблица 20 Условия, при които са съхранявани култури от шамовете, изследвани за генетична стабилност с PCR-RAPD

№	Условия на съхранение	Обозначение на културите					
		<i>Ef</i> (A)	<i>Lh</i> (B)	<i>Lb</i> (C)	<i>Li</i> (E)	<i>St</i> (F)	<i>La</i> (G)
1	1 ден съхранение при Т (+1°C)	A1	B1	C1	E1	F1	G1
2	1 ден съхранение при Т (-70°C)	A2	B2	C2	E2	F2	G2
3	15 дни съхранение при Т (+1°C)	A3	B3	C3	E3	F3	G3
4	15 дни съхранение при Т (-70°C)	A4	B4	C4	E4	F4	G4
5	30 дни съхранение при Т (+1°C)	A5	B5	C5	E5	F5	G5
6	30 дни съхранение при Т (-70°C)	A6	B6	C6	E6	F6	G6
7	Лиофилизация (веднага след приключване на процеса)	A7	B7	C7	E7	F7	G7
8	Лиофилизация (90 дни след процеса)	A8	B8	C8	E8	F8	G8

Ef – *E. faecium*; *Lh* – *L. helveticus*; *Lb* – *L. bulgaricus*; *Li* – *L. lactis*; *St* – *S. thermophilus*; *La* – *L. acidophilus*

Малко изключение прави *L. bulgaricus* NBIMCC 8244, съхраняван 30 дни при 1°C. Вероятно този начин на съхранение повлиява неблагоприятно само виталността на щама, тъй като представената проба е с по-малък обем биомаса.

За разлика от *L. bulgaricus* NBIMCC 8244, изпитваните *L. lactis* NBIMCC 8250, *S. thermophilus* NBIMCC 8253 и *L. acidophilus* NBIMCC 8242 не показват никакви разлики в получените профили и следователно могат да бъдат определени като генетично стабилни при съхранение при +1 и -70°C за срок до 30 дни, както и след лиофилизация.

Независимо, че бактериите се отличават с голяма изменчивост, вкл. в резултат на съхранение при различни условия и температурни режими, липсата на промяна в генетичните им профили може да се приеме като достатъчна гаранция за тяхната генетична стабилност. В допълнение, RAPD-PCR анализите доказват приложимостта на осемте начина за съхранение на шамовете *E. faecium* NBIMCC 8270, *L. helveticus* NBIMCC 8269, *L. lactis* NBIMCC 8250, *S. thermophilus* NBIMCC 8253, *L. acidophilus* NBIMCC 8242.

RAPD-PCR анализите показват пълна генетична идентичност и стабилност на шамовете *E. faecium* NBIMCC 8270, *L. helveticus* NBIMCC 8269, *L. lactis* NBIMCC 8250, *S. thermophilus* NBIMCC 8253, *L. acidophilus* NBIMCC 8242, съхранявани при ниска температура (+1 и -70°C) и лиофилизирани и при *L. bulgaricus* NBIMCC 8244 (съхраняван при -70°C и лиофилизиран).

5. Преживяемост на шамовете по време на съхранение

Изпитана е преживяемостта на млечнокиселите бактерии, участващи в пробиотика и стабилността на тяхната численост в премикси и фуражи, в сравнение с количеството им в началото на експеримента. Числеността на бактериите в трите партии, преди да бъдат допълнени с предварителни смеси е дадена в Табл. 21.

Таблица 21. Численост на млечнокиселите бактерии в три партиди пробиотик Лактина

Партида	CFU/g
1	$4,5 \times 10^{10}$
2	$4,0 \times 10^{10}$
3	$1,5 \times 10^{10}$

Както се вижда от Табл. 22 и 23 в подготовка на гранулирани фуражи е установен една степен намаление на млечно-киселите бактерии, което се дължи на термичната обработка при 80°C. Анализът на гранулирания и комбиниран фураж по отношение на концентрация на млечнокисели бактерии, показва относителна стабилност по отношение на броя.

Таблица 22 Стабилност на пробиотичната смес при концентрация 300 g/t в премикси и фуражи

Численост при различни условия	CFU/g млечнокисели бактерии / партида/ тип фураж		
	Партида 1 (прахообразен)	Партида 2 (гранулиран)	Партида 3 (прахообразен)
Численост в началото	$4,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
след 3 месеца при + 5°C	$2,0 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$
след 6 месеца при + 5°C	$3,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$
след 3 месеца при +18°C	$4,65 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
след 6 месеца при +18°C	$9,5 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$
след 1 седмица при +37°C	$9,0 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$

Таблица 23 Стабилност на пробиотик Лактина във фуражи съхраняван при 23°C, 70% ОВ след добавяне към комбиниран фураж или премикс при концентрация 500 g/t за три различни партиди

Вид на добавката	CFU/g в началото на опита	CFU/g след 1 месец	CFU/g след 2 месеца	CFU/g след 3 месеца
за пилета	$2,5 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$
между 1 ^{ма} и 28 ^а ден	$2,5 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$
	$2,3 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^6$
за пилета	$3,3 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$
между 29 ^а и 40 ^а ден	$3,2 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$
	$3,2 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
пелетизиран	$9,3 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^6$
за зайци	$9,8 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^6$
от 1 ^{ма} до 28 ^а ден	$8,2 \cdot 10^6$	$7,8 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$
Пелетизиран за зайци от 1 ^{ма} до 28 ^а ден	$9,5 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$
	$9,2 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^6$
	$9,0 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^6$	$6,9 \cdot 10^6$

Важен критерий при подбора на пробиотични щамове е броят на жизнеспособните и активни клетки за грам или милилитър продукт в момента на консумацията от животните (Mendoza *et al.*, 2014). Лиофилизацията е процес, който започва със замразяване на микроорганизми, последвано от сублимация (първично сушене) и адсорбция (вторично сушене), за да се намали съдържанието на вода; на този етап не се наблюдават нито

микробен растеж, нито химически или ензимни реакции (Schoug Bergenholtz *et al.*, 2012). Освен това, при производството на комбинирани фуражи МКБ се подлагат на различни стресови технологични процедури. От съществено значение за ефективността на пробиотиците е запазването на жизнеспособността им. Млечнокиселите бактерии не образуват спори и са по-слабо защитени от химически и физични увреждания, възникващи по време на процеса на гранулиране. Вземайки предвид получените резултати от стабилността на пробиотичната смес при концентрация 300 g/t в премикси и фуражи се наблюдава до половин степен снижаване на концентрацията на живи бактерии в рамките на шест месеца. При ускорения тест при 37°C се очертава тенденция за по-големи загуби от около две степени и половина. Вероятно загубата на жизнеспособност зависи от различни фактори, свързани със свойствата на отделните щамове, условията на отглеждане, както и от други фактори, като технология на процеса (технически параметри като скорост на охлаждане и температура). Наличието на минерали и микроелементи няма отражение върху стабилността на пробиотичната смес.

6. Ефективност на добавката Лактина при експериментални животни

Ефективността на пробиотичната добавка Лактина е изследвана в опити с два вида експериментални животни – зайци и пилета-бройлери.

6.1. Зайци

6.1.1. Тегловно развитие

Ефективността на пробиотичната добавка Лактина е изследвана върху зайци от породата Бял Новозеландски от раждането до навършване на 77-дневна възраст. В експеримента са включени 74 броя зайци, разпределени в пет групи, всяка с по три повторения. Подробности по отношение на всички условия, при които опитът е проведен са дадени в раздела Материали и методи. Изпитани са следните дози на пробиотика: 0, 300, 500, 700 и 1000 g/t фураж. Теглото на зайците е измервано в посочените в Табл. 24 интервали, в която са представени и резултатите от изследването.

Таблица 24 Тегло (g) на зайците по периоди и групи

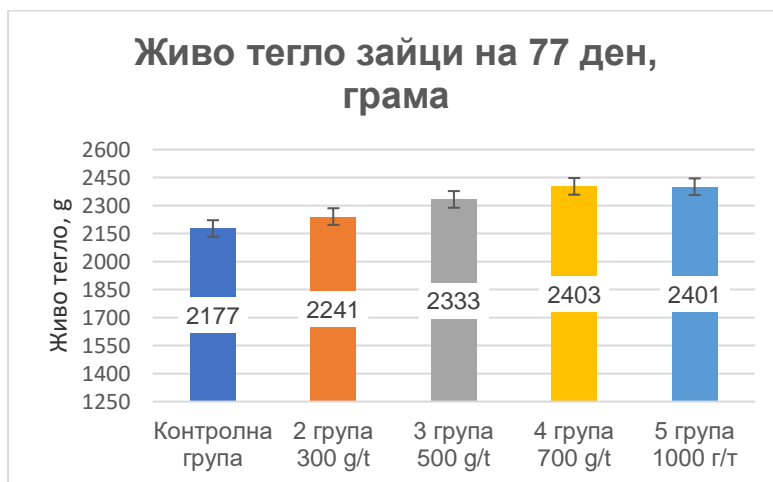
Период	Показател	Контрола	Групи зайци според дозата (g/t фураж) на получавания пробиотик / Тегло (g)			
			300	500	700	1000
1-и ден	xsSd	60,7±4,62	60,0±6,73	59,8±9,31	64,3±17,16	58,5±7,73
	SEM	1,19	1,80	2,40	4,43	1,99
	vc%	7,61	11,22	15,57	26,67	13,21
Достоверност	NS*					
7-и ден	xsSd	150,2±15,16	140,2±15,40	150,5±24,61	150,9±18,38	153,6±14,46
	SEM	3,91	4,12	6,35	4,74	3,73
	vc%	10,09	10,98	16,35	12,18	9,41
Достоверност	NS*					
35-и ден	xsSd	770,7±87,54	797,9±70,73	898,0±118,15	884,0±103,84	980,7±96,25
	SEM	22,6	18,9	30,51	26,81	24,85

Достоверност	vc%	11,36 1:3**; 1:4**;	8,86 2:4*; 2:5***;	13,16 3:5*; 4:5*	11,75	9,81
56-и ден	xsSd	1430,7±228	1569,3±250	1516,7±424	1635,3±312	1696,7±29
	SEM	58,9	66,9	109,5	80,8	75,2
	vc%	15,94	15,97	27,95	19,12	17,16
Достоверност	1:4*; 1:5**					
77-и ден	xsSd	2177,1±305	2241,3±229	2333,3±282	2402,7±289	2401,3±190
	SEM	81,6	63,6	72,9	74,80	49,1
	vc%	14,00	10,21	12,08	12,03	7,49
Достоверност	1:4*; 1:5*	2:5*				

P< 0,05*; P< 0,01**; P< 0,001***; NS- няма достоверност. Цифрите означават номерата на групите.

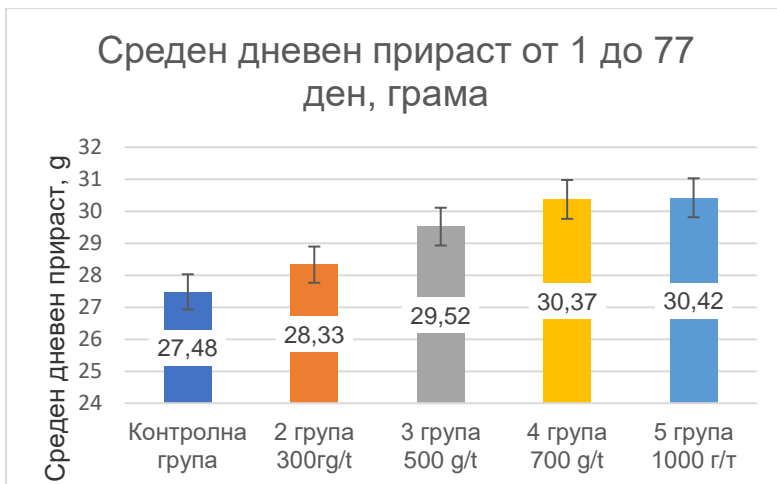
Средното тегло на зайчетата на първия ден е в границите от 58,5 g за пета група до 64,3 g за четвърта група. В тези граници е теглото и на новородените от първа група – 60,7 g, от втора група - 60,0 g и трета група – 59,8 g.

В края на опитния период, на 77-дневна възраст, на зайците достигат живо тегло, което е показано на Фиг. 15. Достоверно по-високо е живото тегло на зайците от четвърта и пета група, получавали комбиниран фураж с участие на Лактина в количество 700 g и 1000 g на тон фураж в сравнение с контролната група. Ефектът е практически еднакъв – 10% по-високо живо тегло.



Фигура 15. Средно живо тегло (g) на опитните зайци от всички групи на 77-ия ден

На Фиг. 16 е представен средният дневен прираст на зайците по групи на 77-дневна възраст. Резултатите показват същата тенденция както и през първия период – с 3,6% по-висок прираст при най-ниската доза в сравнение с контролната група, със 7,4% по-висок прираст при доза 500 g на тон фураж Лактина и с 10,5% по-висок прираст при четвърта и пета група.



Фигура 16. Среден дневен прираст (g) на опитните зайци от всички групи от 1 до 77 ден.

6.1.2. Консумация и оползотворяване на фуража

Изследвана е консумацията и оползотворяването на фураж. На Табл. 25 са представени данни за общото количество изразходван фураж по групи за целия опитен период, дневната консумация за едно зайче и разхода на фураж за единица прираст. Математическата обработка е направена на базата на средните данни от трите повторения за всяка група.

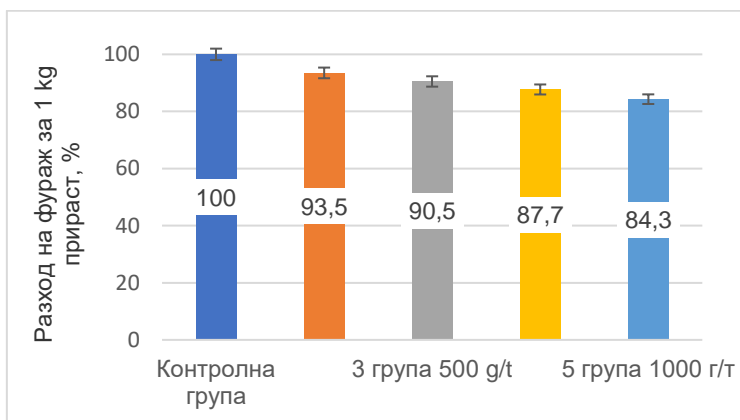
От раждането до навършване на 77-дневна възраст зайците са консумирали различно количество фураж при различните групи, което е показано в Табл. 25. В същата таблица е показана и средно дневната консумация на фураж от зайче за периода от 1 – ия до 77-ия ден, като този показател е изчислен и в проценти от контролната група. Разликите между групите са обаче статистически недостоверни. За периода на провеждания експеримент е изчислен и разходът на фураж за 1 kg прираст по групи. При всички опитни групи оползотворяването на фуража е по-добро в сравнение с контролната - от 6,5% до 15,7% (Фиг. 17).

Таблица 25. Консумация на фураж и оползотворяване на фуража

Групи*	1	2	3	4	5
Показатели					
Консумиран фураж, всичко, kg	136,62	123,57	135,60	135,57	130,20
Консумиран фураж 1-77 ден, g/зайче/ден	118+10,59	107+6,72	117+6,74	117+5,31	113+11,39
% към контролата	100,0	90,7	99,5	99,5	95,8
Разход на фураж за 1 kg прираст, kg	3,232+0,13	3,022+0,10	2,924+0,13	2,836+0,07	2,724+0,12
% към контролата	100	93,5	90,5	87,7	84,3

Достоверност 1:3*; 1:4** ; 1:5**

P<0,05* P<0,01*; 1 – контрола; 2 – доза на пробиотика 300 g/t; 3- 500 g/t; 4- 700 g/t; 5- 1000 g/



Фигура 17. Разход на фураж за 1 kg прираст, %.

6.1.3.Здравословен статус на зайците

По време на опитния период са отпаднали по едно зайче от контролната група и от групата с добавка на 300 g пробиотик/t фураж, а от трета, четвърта и пета група няма отпаднали зайчета. Причина за смъртността е стомашно-чревно разстройство.

На базата на получените резултати могат да се направят следните заключения:

- Добавката на пробиотичната добавка Лактина в количество 500, 700 и 1000 g/t гранулиран фураж от раждането на зайчетата до отбиването на 35-дневна възраст, стимулира растежа и развитието на зайчетата в сравнение с

контролната група като разликите между тези групи опитни животни и контролната група са статистически достоверни ($P < 0,01$).

- През този период резултатите са повлияни и от фактора „млечност на майката“ и тъй като зайчетата започват да консумират от фуража след 12-15-ия ден от раждането, получените резултати не бива да се обясняват единствено и само с влиянието на изпитваната добавка.
- Живото тегло на зайчетата на 56-дневна възраст е положително повлияно от добавката на Лактина, включена в количество 700 и 1000 g/t фураж. Разликата от 14% респективно 18% в сравнение с контролната група е статистически достоверна ($P < 0,05$; $P < 0,01$). По-добрият растеж на зайчетата с 6-10%, получавали Лактина в количество 300 и 500 g/t фураж е статистически недостоверен.
- На 77-дневна възраст зайчетата, получавали Лактина в количество 700 и 1000 g/t фураж достигат практически еднакво живо тегло, по-високо с 10% в сравнение с контролната група ($P < 0,05$).
- Разходът на фураж за 1 kg прираст при всички опитни групи е по-нисък в сравнение с контролната група от 6% до 16%. Най-добро е оползотворяването на фуража при зайчетата, получавали комбиниран фураж с участие на 700 и 1000 g/t фураж Лактина.
- Добавката на 500 – 700 и 1000 g/t гранулиран фураж Лактина е повлияла положително преживяемостта на зайчетата. В тези групи няма отпаднали животни през целия опитен период в сравнение с контролната група и групата с най-ниската дозировка на изпитваната добавка, в които са отпаднали по едно зайче.
- Комплексната оценка на резултатите от проведеното изпитване дават основание да се препоръча като оптимална дозата от 700 g пробиотик Лактина на тон гранулиран фураж към комбинираните фуражи за зайци от раждането до 77-дневна възраст т.е. през бозайния и угоителен период.

6.2 Пилета

6.2.1. Теглово развитие

Ефективността на пробиотичната добавка Лактина върху развитието на пилета е изследвана чрез провеждането на експеримент с мъжки пилета-бройлери от хибридна комбинация Ross 308 при условията на клетъчно отглеждане. Във всеки опит са включени по 120 пилета, разпределени в четири групи, всяка с по три повторения и с по десет пилета в подгрупа. Изпитани са следните дози на пробиотика: 0, 300, 500, 700 g/t

фураж. Теглото на пилетата е измервано в посочените в Табл. 26 интервали, в която са представени и резултатите от изследването.

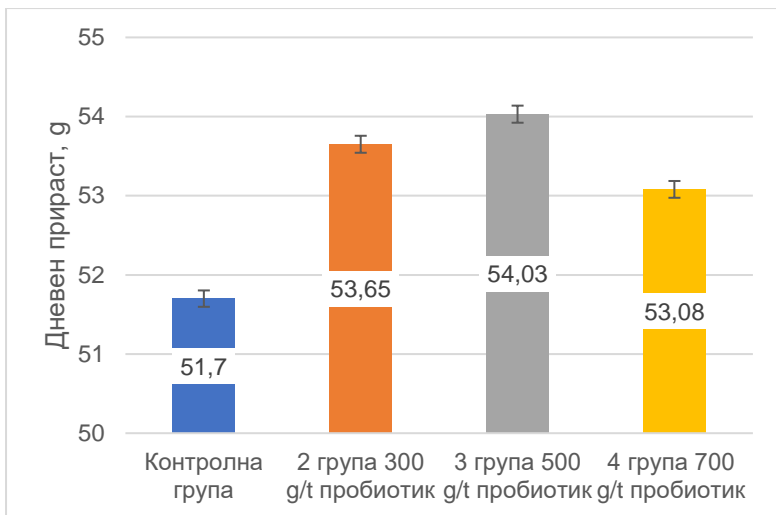
Таблица 26 Живо тегло (g) на пилетата

Период	Показател	Контрола	Групи пилета според дозата (g/т фураж) на получавания пробиотик / Тегло (g)		
			300	500	700
1-и ден	x±Sd	45,2±2,06	46,1±2,36	45,4±2,37	45,8±2,50
	SEM	0,38	0,43	0,43	0,45
	vc%	4,56	5,12	5,22	5,46
Достоверност		NS			
12-и ден	x±Sd	251,7±22	256,8±28	260±15	262,3±29
	SEM	4,05	5,10	2,76	5,27
	vc%	8,67	10,86	5,80	11,00
Достоверност		NS			
27 ден	x±Sd	1053,3±59	1088,1±86	1103,2±92	1113,2±66
	SEM	10,88	16,09	16,78	12,04
	vc%	5,66	7,96	8,33	5,93
Достоверност		1:3*; 1:4***			
40-и ден	x±Sd	2112,6±190	2192,0±258	2205,6±159	2169,2±269
	SEM	34,75	47,96	29,16	49,25
	vc%	8,99	11,77	7,20	12,40
Достоверност		1:3*			

* P< 0,05; ***P< 0,001; NS- няма достоверност. Цифрите означават номерата на групите. vc% – коефициент на вариация.

Еднакво добро е изравняването в теглото между пилетата вътре във всяка група, което се доказва с вариационните коефициенти, които са много близки (Табл. 26). Опитите стартираха с добро живо тегло на пилетата (по технология за пилетата Ross 308 на 0-ия ден се дава живо тегло от 42 g за женските и мъжки пилета.

Родителското стадо, от което са получени яйцата за люпене е на 53-седмична възраст, когато и теглото на яйцата е по-високо в сравнение с това при младите родителски стада. В края на експерименталния период (40-дневна възраст на пилетата) теглото на пилетата по групи варира между 2113 (при контролната група) до 2206 g (при групата, получавала добавката в доза от 500 g на тон фураж). Пилетата от втора група, получавали комбиниран фураж с най-ниската доза (300 g на тон фураж), превъзхождат по тегло контролната група с 3,7%, а тези от трета група (с доза 500 g) - достоверно увеличение на живата маса с 4,4%, като разликата е статистически достоверна (P < 0.05%). Добавката на 700 g на тон фураж от изпитвания пробиотик осигурява 2,7% по-висока жива маса при пилетата от четвърта група в сравнение с контролната. Средният дневен прираст на пилетата по групи за целия опитен период е представен на Фиг. 18, като установената тенденция на дневния прираст през финишерния период се потвърждава и тук (най-висок прираст се наблюдава при пилета от втора и трета група).



Фигура 18. Дневен прираст (g), за целия период

6.2.2. Консумация и оползотворяване на фураж

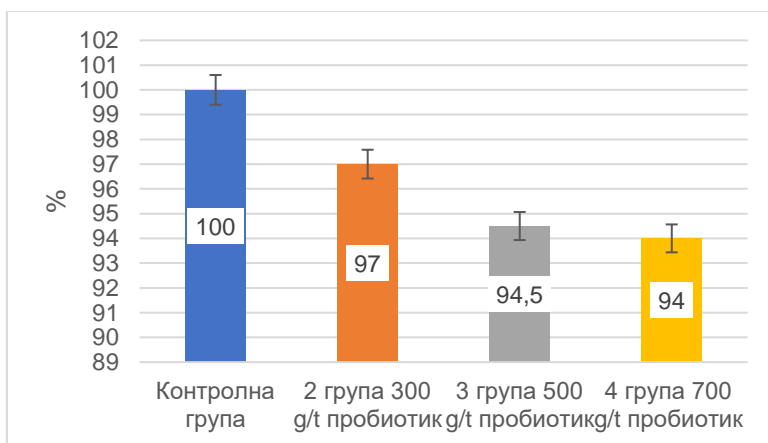
Общата консумация на фураж по периоди, дневната консумация за едно пиле и разхода на фураж за единица прираст са показани на Табл. 27. Установява се, че по време на стартерния период, който продължава 12 дни оползотворяването на фуража при всички опитни групи е по-добро в сравнение с контролната група, за които единица прираст е получен с по-нисък разход на фураж. Статистически достоверна е обаче разликата само между всяка от групите с четвърта група.

За целия опитен период дневната консумация на фураж по групи е показана в Табл. 27. Данните за оползотворяването на фуража в процент от контролната група са представени на Фиг. 19. При всички опитни групи е установено по-добро оползотворяване на фуража в сравнение с контролната група. Статистически достоверна е разликата между контролната и трета и четвърта група.

Таблица 27. Консумация и оползотворяване на фуража

Показатели	Група	1	2	3	4
Стартерен период					
Консумиран фураж, общо, kg		12.200	11.290	12.210	10.400
Дневна консумация на фураж		33,9±1,72	31,4±1,27	33,9±0,55	28,9±1,28
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		1,975±0,05	1,793±0,11	1,897±0,03	1,601±0,04
% към контролната група		100	90,8	96,1	81,6
Гроуерен период					
Консумиран фураж, общо, kg		43.200	42.750	42.050	41.370
Дневна консумация на фураж		96,0±4,16	98,2±1,53	93,5±6,19	91,9±2,80
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		1,795±0,04	1,713±0,11	1,663±0,09	1,621±0,03
% към контролната група		100	95,4	92,6	90,3
Финишерен период					
Консумиран фураж, общо, kg		63.990	63.880	63.690	63.520
Дневна консумация на фураж		164,1±2,01	169,4±5,70	163,3±7,28	162,9±10,53
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		2,015±0,04	1,930±0,10	1,928±0,08	2,006±0,02
% към контролната група		100	95,8	95,7	99,6
Общо за целия опитен период					
Консумиран фураж, общо, kg		119.390	117.920	117.950	115.290
Дневна консумация на фураж		99,5±2,46	99,9±2,95	98,3±1,13	96,1±2,92
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		1,925±0,02	1,867±0,05	1,820±0,02	1,810±0,02
% към контролната група		100	97,0	94,5	94,0

** P < 0,01; 1 – контролна група (без добавка на пробиотики); 2- група с добавка на пробиотик от 300 g/фураж; 3 – група с добавка на пробиотик от 500 g/фураж; 4- група с добавка на пробиотик от 700 g/фураж



Фигура 19. Конверсия на фуража (% спрямо контролата) за целия опитен период

6.2.3. Индекс на продуктивност

Индексът за продуктивност е изчислен по следната формула:

$$\text{ИП} = \frac{\text{Живо тегло (kg)} \times \text{преживяемост (\%)} \times 100}{\text{Срок на отглеждане (дни)} \times \text{разход на фураж за 1 kg прираст.}}$$

Данните са представени в Табл. 28.

Таблица 28. Индекс на продуктивност

Група	Живо тегло на 40-ия ден, kg	Преживяемост, %	Конверсия на фураж, kg/kg	Индекс на продуктивност	
				Абсолютна стойност	% към контролата (група 1)
1	2,113	100	1,925	274	100
2	2,192	96,7	1,867	284	103,6
3	2,206	100	1,820	303	110,6
4	2,169	100	1,810	299	109,1

За по-обективна оценка на изпитваната добавка е определен индексът на продуктивност. Анализирайки данните за този индекс (Табл. 28) се вижда, че по-високи стойности са установени за опитните групи в сравнение с контролната, като този показател е най-висок при групата с добавка на 500 g Лактина на тон фураж следвана от четвърта група с добавка на 700 g.

Получените от нас резултати показват, че се наблюдава доказан положителен ефект по отношение на теглото, предизвикан вероятно от промени в чревната микрофлора, които са щамово специфични.

6.2.4. Здравословен статус на птиците

По време на стартерния период няма отпаднали пилета в нито една от групите, а през гроуерния период - едно пиле от втора група.

Анализът на получените резултати дава основание да се направят следните заключения:

- Добавката на пробиотик Лактина в количество 500 и 700 g/t фураж подобрява статистически достоверно тегловното развитие на пилета-бройлери през стартерния и гроуерен период (1 – 27 ден) с 4,7 до 5.7%, съответно, в сравнение с контролната група.
- Добавката на Лактина в количество 500 g/t фураж осигурява статистически достоверно (при P=0.04) по-високо живо тегло на пилетата в края на опитния

период (40-дневна възраст на пилетата) с 4,4% спрямо това на пилетата от контролната група.

- Във всички опитни групи добавката на микс от млечнокиселите бактерии благоприятства намаляването на разхода на фураж за 1 kg прираст. Конверсията на фуража е най-добра при групите, получавали добавката в доза от 500 и 700 g на тон фураж 5,5% и 6% съответно, като разликите с контролата са статистически достоверни.
- Индексът на продуктивност е по-добър при опитните групи зайци, получавали добавката Лактина в сравнение с този на контролната група. Най-висока стойност този показател има (10.6%) при групата, получавала Лактина в доза от 500 g на тон фураж.
- Комплексната оценка на резултатите от проведения експеримент за установяване на ефективността на добавката Лактина, приложена в различни дози, показва че оптималната доза на пробиотика в комбинираните фуражи за пилета-бройлери през целия период на отглеждане е 500 g/t фураж.

7. Поносимост на пробиотична добавка Лактина при експериментални животни

Експериментите, с които се установява поносимостта на пробиотичната добавка Лактина е проведена с два вида експериментални животни – зайци и пилета-бройлери.

7.1. Зайци

За изследване на поносимостта на добавка Лактина е проведен експеримент, в който са включени 91 броя зайци, разпределени в четири групи, всяка с по три повторения. Първа група не получава пробиотик с фуража и се използва за контрола; втора група получава комбиниран фураж с добавка на пробиотик в установената в предходния експеримент оптимална препоръчителна доза (700 g/t фураж); трета група получава комбиниран фураж с 10-кратно завишена препоръчителна доза; четвърта група получава 100-кратно завишена доза пробиотик спрямо оптималната. Условиата на отглеждане, програмата на хранене, състава на комбинираните фуражи и контролираните показатели при този експеримент са аналогични на тези при предходния.

7.1.1. Теглово развитие

Средното тегло на зайчетата на първия ден варира при различните групи и е в границите от 54,6 g за втора група до 59,9 g за контролата (Табл. 29). Теглото на зайчетата на 7-дневна възраст е показано в същата таблица и то също варира между групите, но при тези стойности все още не може да се търси връзка между тяхното теглово развитие и изпитвания пробиотик, защото те още само бозаят и не консумират фураж. След 15-дневна възраст зайчетата започват да приемат и от фуражната смеска,

като продължават да бозаят и от майките. На 35-я ден става отбиването на приплодите и се извършва следващият контрол на живото им тегло. При зайците от втората група, получавали комбиниран фураж с участие на Лактина в препоръчителната оптимална доза 700 g/t фураж се наблюдава по-високо живо тегло с 10,6% в сравнение с контролната група ($P<0,01$). Живата маса при групата с десетократно увеличение на препоръчителната доза е с 3,7% е по-висока спрямо контролата и с 1,8% при четвърта група (със стократно увеличената оптимална доза).

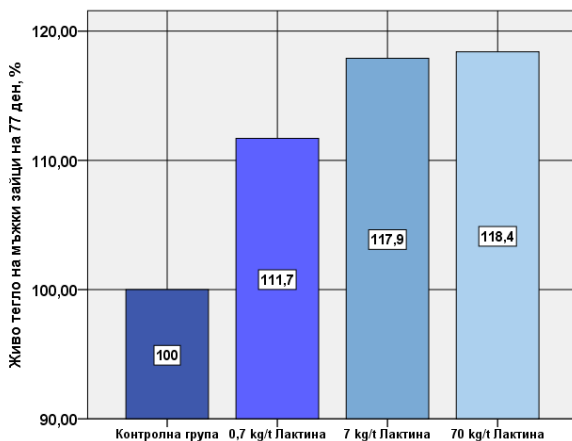
Данните за тегловното развитие на зайците по периоди са представени в Табл. 29.

Таблица 29. Живо тегло (g) на зайците

Период	Показател	Контрола	Групи зайци според дозата (g/t фураж) на получавания пробиотик / Тегло (g)		
			700	700x10	700x100
1-и ден	x±Sd	59,9±4,43	54,6±8,27	59,4±12,90	59,8±6,78
	SEM	0,94	1,69	2,76	1,41
	vc%	7,39	15,14	21,72	11,34
Достоверност		2:4*			
7-и ден	x±Sd	127,6±12,47	140,2±25,28	139,8±33,77	139,5±22,78
	SEM	2,79	5,27	7,55	4,75
	vc%	9,77	18,03	24,15	16,33
Достоверност		1:2*			
35-и ден	x±Sd	834,5±99,71	923,2±98,87	865,8±148,45	849,6±115,38
	SEM	22,29	21,07	34,06	24,06
	vc%	11,95	10,71	17,14	13,58
Достоверност		1:2**; 2:4*			
56-и ден (мъжки)	x±Sd	1500,0±162	1760,0±145	1724,5±252	1745,0±238
	SEM	47,0	48,4	76,2	68,7
	vc%	10,80	8,24	14,61	13,64
Достоверност		1:2***; 1:3**;	1:4**		
56-и ден (женски)	x±Sd	1320,0±197	1459,2±87	1630,0±176	1532,7±212
	SEM	69,6	25,0	66,7	63,9
	vc%	14,92	5,96	10,80	13,83
Достоверност		1:2*; 2:3*; 1:3**;	1:4*		
77-и ден (мъжки)	x±Sd	2019,2±202	2256,7±304	2381,8±314	2390,8±323
	SEM	58,5	101,4	94,8	93,4
	vc%	10,00	13,47	13,18	13,51
Достоверност		1:2*; 1:3**1:4**			
77-и ден (женски)	x±Sd	1871,3±158	1895,0±153	2174,3±236	2117,3±192
	SEM	55,9	44,2	89,2	57,8
	vc%	8,44	8,07	10,85	9,07
Достоверност		2:3**; 1:3*;	1:4**; 2:4**		

P< 0,05*; P< 0,01**; P< 0,001***; NS- няма достоверност.

В края на опитния период, на 77-дневна възраст мъжките зайци достигат живо тегло в границите от 2019,2 g (при контролните животни) до 2390,8 g (при екземплярите от четвърта група, които получават 100-кратно по-висока от препоръчителната доза пробиотик). Разликите в теглото на опитните групи и контролната са статистически достоверни. Животните, приемали препоръчителната доза пробиотик имат с 11,7% по-високо живо тегло в сравнение с контролната група, а при следващите две опитни групи процентът е още по-висок - 18% (Фиг. 19).



Фигура 19. Живо тегло (в % спрямо контролата) на мъжките зайци на 77 ден

7.1.2. Консумация и оползотворяване на фуража

Данните за общото количество изразходван фураж по групи за целия опитен период, дневната консумация за едно зайче и разхода на фураж за единица прираст са показани в Табл. 30. Математическата обработка на резултатите е направена на базата на средните данни от трите повторения за всяка група.

За периода от 1 до 77 ден т.е от раждането до края на опита средно дневната консумация на фураж на зайче е най-висока при четвърта група (получавала 100-кратно по-висока доза пробиотик) - 80,08 g. Разликите между групите по този показател са обаче статистически недостоверни.

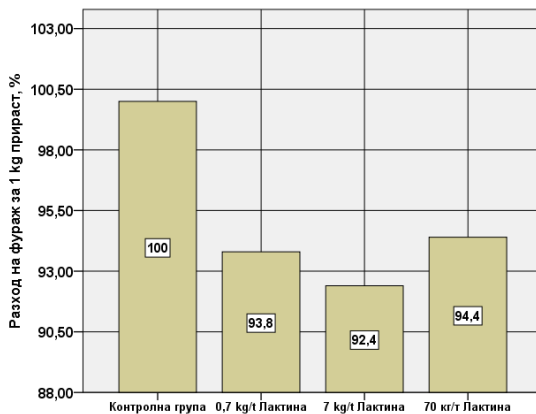
За същия период разходът на фураж за 1 kg прираст е по-нисък при опитните групи и най-нисък при животните от трета група (получавали 10-кратно по-висока доза). Оползотворяването на фуража при тях е по-добро с 6 до 8% в сравнение с контролната група (Фиг. 20).

Таблица 30. Консумация на фураж и оползотворяване на фуража

Групи	1	2	3	4
Показатели				
Консумиран фураж, всичко, kg	113,00	118,60	112,55	141,80
Консумиран фураж 1-77 ден, g/зайче/ден	73,99±5,49	72,34±7,98	79,63±5,49	80,08±0,54
% към 1 група	100,0	97,77	107,62	108,23

Разход на фураж за 1 kg прираст, kg	2,963±0,09	2,775±0,10	2,73±20,08	2,785±0,04
% към 1 група	100	93,8	92,4	94,4
Достоверност	1:2*; 1:3*; 1:4*			

P<0,05*; 1 – контрола; 2 – доза на пробиотика 700 g/t; 3- 700x10 g/t; 4- 700x100 g/t



Фигура 20. Разход на фураж (в %) за 1 kg прираст

7.1.3.Кланичен анализ

След приключване на опита, по четири мъжки заека от група, с живо тегло близко до средното за групата, са хуманно умъртвени и е направен подробен медицински преглед. Той включва трупче и вътрешни органи: тестиси, сърце, черен и бял дроб, далак, бъбреци, стомах и храносмилателен тракт. Направен е и кланичен анализ и определяне теглото на вътрешните органи. Резултатите от този анализ са представени в Табл. 31.

Не са установени значими разлики по отношение на изследваните показатели между групите. В грила не е включена главата на закланите животни. Рандеманът на грила е практически еднакъв при всички групи – 52-54%. Абсолютните стойности за теглото на отделните вътрешни органи при всички групи са в нормални граници, което показва отсъствие на негативно влияние на завишените дози Лактина върху здравния статус на зайците и добра поносимост на продукта.

Таблица 31. Класичен анализ на зайците

Показатели	Групи експериментални животни			
	1	2	3	4
Живо тегло, g	2508±286	2653±153	2588±261	2798±204
Грил, g	1310±114	1395±126	1408±153	1473±118
Рандеман грил,%	52,2	52,6	54,4	52,6
Тестиси, g	5,85±2,09	5,45±2,01	7,73±2,22	7,05±1,34
Бъбреци, g	16,52±2,98	16,62±2,79	19,05±4,59	19,67±4,56
Бял дроб, g	14,3±3,41	14,45±1,74	17,87±1,33	15,90±2,01
Черен дроб, g	76,13±14,71	82,52±9,15	74,10±10,54	82,80±3,57
Сърце, g	8,33±1,38	7,85±0,45	8,47±1,49	8,25±1,05
Далак, g	2,97±0,39	2,00±0,22	2,27±0,56	2,25±0,70
Стомах, g	24,05±5,98	26,17±2,84	24,65±0,62	27,10±3,34

1 – контрола; 2 – доза на пробиотика 700 g/t; 3- 700x10 g/t; 4- 700x100 g/t

Заключение: *Нормално развити организми, без видими патологични промени.*

7.1.4.Здравословен статус на зайците

По време на опитния период са отпаднали две зайчета от контролната група преди достигане на 7-дневна възраст, три зайчета от групата с препоръчителната оптимална доза, от които две непосредствено след раждането и 1 след навършване на 7-дневна възраст, преди периода на отбиване, четири зайчета от трета група, от които две непосредствено след раждането, едно преди отбиването и едно след периода на отбиване. Няма отпаднали животни от четвърта група по време на експеримента.

Получените резултати могат да бъдат обобщени по следния начин:

- При условията на проведения експеримент от раждането до отбиването на 35-дневна възраст опитните зайчета от групата, получавала препоръчаната доза пробиотик от 700 g/t гранулиран фураж постигат с 10,6% по-високо живо тегло в сравнение с контролната група.
- През посочения период обаче резултатите са повлияни и от фактора „млечност на майката“ и тъй като зайчетата започват да консумират от фуража след 12-15 ден от раждането, получените резултати не биха могли да бъдат обяснени единствено с влиянието на изпитваната пробиотична добавка.
- Живото тегло на мъжките и женските зайчета на 56-дневна възраст е положително повлияно от добавката на Лактина, включена в количество 700 g/t фураж. Разликата от 17% при мъжките и 10,5% при женските животни в сравнение с контролната група е статистически достоверна (съответно при $P<0,001$ и $P<0,05$).
- На 77-дневна възраст мъжките зайци, получавали Лактина в количество 700 g/t фураж достигат живо тегло по-високо с 11,7% в сравнение с контролната група ($P<0,05$). При женските зайци е установена тенденция за по-добър прираст с 1,3% в сравнение с контролната група.

- Разходът на фураж за 1 kg прираст при всички опитни групи е по-нисък в сравнение с контролната група от 5,6% до 7,6%.
- При изпитването 10- и 100-кратно завишени дози на пробиотика Лактина не е установено неблагоприятно влияние върху растежа и развитието на зайците. Тяхното живо тегло е сравнимо с това на контролната група или по-добро, както и с теглото на зайците от групата, приемали препоръчителната доза пробиотик.
- Десеткратно и стократно завишената доза на пробиотика спрямо препоръчителната оптимална доза не повлияват неблагоприятно вкусовите качества на смеската, апетита на зайците и дневната консумация на фураж.
- При проведения патологоанатомичен преглед на зайци и техните вътрешни органи и направения кланичен анализ не се установяват изменения и неблагоприятно влияние на изпитваните 10- и 100-стократно завишените дози на Лактина.

7.2. Пилета

За оценка на поносимостта на пробиотичната добавка Лактина при пилета е проведен експеримент при аналогични условия на отглеждане, програма на хранене и състав на комбинираните фуражи с тези при опита за ефективност с тази разлика, че сега се работи с женски пилета, което позволява натрупването на данни и резултати от изследванията и за двата пола, тъй като в практиката съотношението между женските и мъжки пилета е приблизително 1:1.

7.2.1. Тегловно развитие

Резултатите от проследяването на тегловното развитие на пилетата са представени по периоди и експериментални групи в Табл. 32.

Таблица 32 Живо тегло (g) на експерименталните пилета

Период	Показател	Контрола	Групи пилета според дозата (g/l фураж) на получавания пробиотик / Тегло (g)		
			500	500x10	500x100
1-и ден	x±Sd	43,7±1,41	43,9±1,41	43,7±1,54	43,6±1,77
	SEM	0,26	0,26	0,28	0,32
	vc% NS	3,23	3,21	3,53	4,06
Достоверност					
14-и ден	x±Sd	349,3±51	364,8±34	350,3±36	380,5±40
	SEM	9,25	6,36	6,64	7,32
	vc% 1:4*; 3:4**	14,50	9,38	10,21	10,54
Достоверност					
28 ден	x±Sd	1044,8±119	1123,4±121	1081,0±152	1108,5±140
	SEM	21,72	22,55	28,25	25,66
	vc% 1:2*; 1:4*	11,39	10,80	14,07	12,68
Достоверност					
42-и ден	x±Sd	1844,7±151	1990,3±179	1908,3±205	1968,0±161
	SEM	27,7	33,3	38,08	29,46
	vc% 1:2**; 1:4**	8,18	8,99	10,74	8,18
Достоверност					

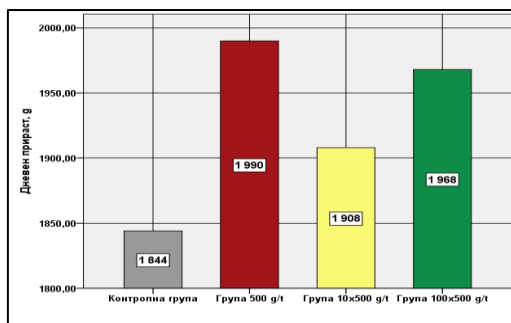
* P< 0,05; **P<0,01;***P< 0,001; NS- няма достоверност. Цифрите означават номерата на групите. vc% – коефициент на вариация

Средното живо тегло на пилетата от различните на първия ден показва слаби вариации и е в границите от 43,6 g за четвърта група, до 43,9 g при пилетата от втора група (Табл. 32). Групите са добре изравнени по този показател, а разликите между тях са в рамките на допустимото отклонение от 5%. Еднакво добра е и изравнеността при залагане на опита между пилетата вътре във всяка група, което се доказва с вариационните коефициенти, които са много близки (3.23, 3.21, 3.53 и 4.06, съответно за първа, втора, трета и четвърта група).

Опитът стартира с добро живо тегло на пилетата. По технология за пилетата Ross 308 на 0 ден за женските и мъжки пилета се дава живо тегло от 42 g. Пиленцата са жизнени и с добър здравословен статус, което се потвърждава и от данните за липса на отпаднали пилета през първата седмица във всички групи. Средното живо тегло на пилетата на 14-дневна възраст, при смяната на стартерния с гроуерен фураж, е в границите от 349 g при контролната група до 381 g при четвърта група. С най-ниско живо тегло са пилетата от контролната група, получавали комбиниран фураж без добавка на пробиотика Лактина. С 4,4% е по-високо живото тегло при пилетата от втора група, към комбинирания фураж на които е добавена Лактина в количество 500 g на тон фураж, каквато е установената в предишния опит препоръчителна оптимална доза. Разликата между двете групи е статистически недостоверна при $P=0,17$. С най-добър растеж са птиците от четвърта група, при които е изпитана стократно по-високата от препоръчителната доза, което е един от критериите за добра поносимост на продукта. Разликата между контролната и тази група е статистически достоверна при $P<0,05$. Практически няма разлика по отношение на живото тегло на 15-дневна възраст между пилетата получавали комбиниран фураж без добавка на Лактина и тези хранени с фуражни смеси с десетократно завишение на дозировката.

В края на експеримента (42-дневна възраст на пилетата) те достигат тегло вариращо между групите от 1844 g (при контролата) до 1990 g при групата, получавала препоръчителната доза от добавката, като тяхното тегло е с 146 g (7,9%) по-високо от това на контролните пилета. Тази разлика е статистически достоверна при $P<0,01$.

Средният дневен прираст на пилетата по групи за целия опитен период е представен на Фиг. 20 и е най-висок при пилетата от втората експериментална група.



Фигура 20. Дневен прираст (g) за целия експериментален период

7.2.2. Консумация и оползотворяване на фуража

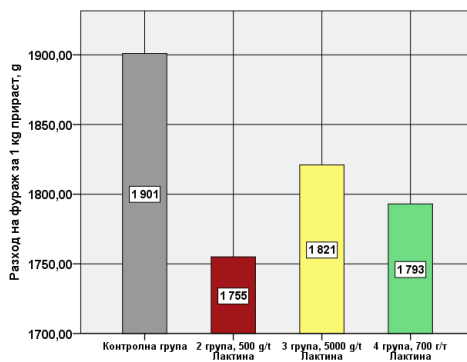
На Табл. 33 са представени данните за общата консумация на фураж по периоди, дневната консумация за едно пиле и разхода на фураж за единица прираст. По време на стартерния период, който продължава 14 дни общо консумираният фураж по групи е в границите от 19,100 kg за контролната група до 17,200 kg при втора експериментална група. Средно дневната консумация на фураж за едно пиле през този период е най-висока при контролата, а най-ниска при пилетата от втората група (Табл. 33), като и оползотворяването на фуража е най-добро при същата група, получавала препоръчителната доза пробиотик от 500 g/t фураж. Подобно е положението и в трета и четвърта група, където дозите на пробиотика са завишени 10 и 100 пъти съответно. Разликите между контролната и всяка от опитните групи са статистически достоверни, както и между трета и четвърта група.

За целия опитен период дневната консумация на фураж по групи е много близка (Табл. 33), което показва че птиците от опитните групите консумират практически еднакво фуража и няма данни за негативно влияние върху вкусовите качества на фуража и апетита на птиците. Сравняването на данните за оползотворяването на фуража, показва, че то е най-високо при пилетата от втората група (1755 g/kg прираст) разликите в стойностите на този показател между контролата и всички групи, получавали пробиотичната добавка са статистически достоверни. Данните за оползотворяването на фуража представени в процент от контролната група са: 100% – 92,3 % - 95,8% и 94,3%, а в абсолютни стойности: 1901 – 1755 – 1821- 1793 g/kg прираст (Фиг. 21). Разликите между контролната и опитните групи са статистически достоверни.

Таблица 33 Консумация и оползотворяване на фуража

Показатели	Група	1	2	3	4
Стартерен период					
Консумиран фураж, общо, kg		19,100	17,200	17,550	17,400
Дневна консумация на фураж		45,3±3,06	40,7±4,16	41,7±2,08	42±2,65
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		2,083±0,01*	1,782±0,13*	1,915±0,00*	1,721±0,08*
Процент към контролната група		100	85,5	91,9	82,6
Гроуерен период					
Консумиран фураж, общо, kg		32,800	32,530	32,590	33,140
Дневна консумация на фураж		78,0±6,93	77,3±4,16	77,3±9,81	78,7±3,51
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		1,571±0,10	1,431±0,04	1,477±0,06	1,517±0,05
Процент към контролната група		100	91,1	94,0	96,6
Финишерен период					
Консумиран фураж, общо, kg		50,770	50,600	49,730	53,000
Дневна консумация на фураж		121,0±4,58	120,7±6,66	118,7±5,03	126,0±1,00
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		2,119±0,07	2,017±0,13	2,074±0,04	2,055±0,01
Процент към контролната група		100	95,2	97,9	97,0
Общо за целия опитен период					
Консумиран фураж, общо, kg		102,670	100,330	99,870	103,540
Дневна консумация на фураж		81,3±2,52	81,3±2,08	80,7±5,13	82,0±1,00
Разход на фураж за 1kg прираст, kg		1,901±0,02	1,755±0,06	1,821±0,03	1,793±0,00
Процент към контролната група		100	92,3	95,8	94,3
Достоверност					
		1:2*; 1:3*; 1:4**			

1 – контролна група (без добавка на пробиотики); 2- група с добавка на пробиотики от 500 г/фураж; 3 – група с добавка на пробиотики от 500x10 г/фураж; 4- група с добавка на пробиотики от 500x100 г/фураж



Фигура 21. Разход на фураж (g) за 1 kg прираст за целия опитен период.

7.2.3. Индекс на продуктивност

Определен е и индексът на продуктивност по следната формула:

$$\text{ИП} = \frac{\text{Живо тегло (kg)} \times \text{преживяемост (\%)}}{\text{Срок на отглеждане (дни)} \times \text{разход на фураж за 1 kg прираст}} \times 100$$

Данните са стойностите на този индекс са представени в Табл. 34.

Таблица 34. Индекс на продуктивност

Група	Живо тегло на 42-ия ден, kg	Преживяемост, %	Конверсия на фураж kg/kg	Индекс на продуктивност	
				Абсолютна стойност	% към контролата (група 1)
1	1,845	100	1,901	231	100,0
2	1,990	99	1,755	267	115,6
3	1,908	99	1,821	247	106,9
4	1,968	100	1,793	261	112,9

Анализирайки данните за този индекс (Табл. 34), се вижда, че по-високи стойности са установени за всички опитни групи в сравнение с контролната, като този показател е най-добър и практически еднакъв при групата с добавка на 500 г Лактина на тон фураж и при четвърта група с добавка на стократната препоръчителна оптимална доза.

7.2.4. Преживяемост на птиците

По време на опитния период само от втора и трета група са отпаднали по едно пиле. При направената аутопсия на отпадналите пилета не са установени изменения във вътрешните органи или признаци за заболяване.

7.2.5. Кланичен анализ

След приключване на опита, по 6 пилета от първа и от четвърта група са хуманно умъртвени и е направен подробен медицински преглед. Той включва трупче и вътрешни органи: сърце, черен дроб, далак, мускулест и жлезист стомах и храносмилателен тракт. Направен е и кланичен анализ и разфасовка на трупчетата. Резултатите от кланичния анализ са представени в Табл. 35.

Таблица 35. Резултати от кланичния анализ на пилетата

Показатели	Абсолютно тегло (g)		Относително тегло (g)	
	1 група	4 група	1 група	4 група
Живо тегло, g	2050±63	2007±65	2050±63	2007±65
Братфертиг, g	1565±48	1582±88	1565±48	1582±88
Рандеман, братфертиг, %	76,2±0,50	78,8±2,03	76,3±0,50	78,8±2,03
Гърди, g	512±28	554±49	32,7±0,97	35,0±2,63
Бутче, g	218±4,10	217±9,4	13,9±0,49	13,7±0,74
Воденичка, g	40,00±1,90	39,00±2,76	2,55±0,06	2,47±0,24
Черен дроб, g	30,67±6,53	33,33±5,35	1,96±0,38	2,10±0,29
Сърце, g	7,83±0,98	8,67±1,75	0,50±0,04	0,55±0,10
Далак, g	1,67±0,51	1,67±0,51	0,10±0,03	0,10±0,03

Братфертигът включва изчистеното трупче с ядивните вътрешности като сърце, черен дроб, мускулест стомах, заедно с жлезистия стомах и далак, а така също и шийката. Гърдите включват гръдната мускулатура с гръдната кост. Освен абсолютното

тегло на вътрешните органи е представено и тяхното относително тегло в процент от братфертига, за да се елиминира тяхната зависимост от големината на пилетата.

Не са установени значими разлики по отношение на изследваните показатели между контролната група и групата със стократно завишение на препоръчителната доза. В братфертига е включена и шийката на пилетата, а рандеманът в опитната група е по-висок в сравнение с контролната. Гърдите са в границите между 512 и 554 грама или 33-35% от братфертика. Относителното тегло на бутче, воденичка, черен дроб, сърце и далак са практически еднакви и при двете групи, което показва отсъствие на негативно влияние на завишените дози Лактина върху здравния статус на пилетата и следователно поносимост на продукта.

Патологоанатомичният преглед на животните показва следното състояние:

Заключение: *Нормално развити птици, без видими патологични промени във вътрешните органи.*

Данните от проведеното изследване дават основание за следните заключения:

- Добавянето на препоръчителната оптимална доза Лактина от 500 g/t фураж към комбинираните фуражи за пилета-бройлери, при условията на проведения експеримент, подобрява достоверно тегловното развитие на пилетата на 28 ден с 7,5% ($P < 0.05$) и в края на опитния период на 42 ден със 7,9 ($P < 0.01$) в сравнение с контролната група. В края на опитния период пилетата от опитната група достигат живо тегло с 145 g по-високо в сравнение с контролната група.
- Десеткратната и стократна завишена препоръчителна оптимална доза на добавка Лактина не оказват неблагоприятно влияние върху растежа на пилетата. Живото тегло на птиците, приемали такива дози, измерено на 14, 28 и 42 ден е сравнимо или по-добро от това на контролната група.
- Най-нисък разход на фураж за единица прираст е постигнат при групата пилета, приемали оптималната доза пробиотик -1,755 kg/kg прираст, а оползотворяването на фуража е със 7,7% по-добро в сравнение с контролната група. При останалите групи оползотворяването на фуража е също по-високо от контролата.
- Десеткратно и стократно завишената препоръчителна оптимална доза на добавката Лактина не повлияват неблагоприятно вкусовите качества на смеската, апетита на пилетата и дневната консумация на фураж.
- При проведения патологоанатомичен преглед на пилетата и техните вътрешни органи и направения кланичен анализ не се установяват изменения и неблагоприятно влияние на изпитваните 10- и 100-кратно завишени дози на Лактина.

8.Изследване на ефекта на пробиотична добавка Лактина върху отделянето на *E. coli* non-O157 STEC при овце

За да се установи способността на пробиотичната добавка Лактина да намалява фекалното изхвърляне на щам *E. coli* non-O157 STEC (серотип O11; щам SJ3) е проведен експеримент, в който са включени 20 броя женски овце от породата Santa Ines в етап на угояване.

Началото на експеримента се предшества от 3-седмичен адаптационен период, през който животните получават само фураж. За коректно провеждане на следващия етап от опита и получаване на достоверни резултати през този период ежеседмично животните са анализирани за наличие във фекалиите на STEC. Анализът е извършен по процедура, описана в раздел Материали и методи, а резултатите показват пълно отсъствие на STEC във всички тествани животни през адаптационния период.

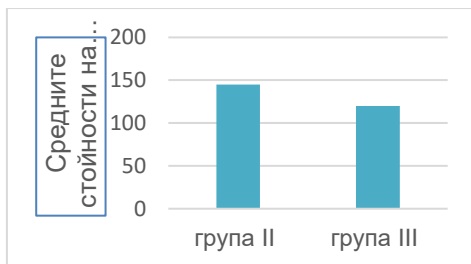
След периода на адаптация животните са разпределени в три групи, които са третирани по начин, описан в Табл. 36, като представителите на всяка група са анализирани за наличие на STEC ежеседмично в продължение на седем седмици. За да се потвърди, че изолираните лактозо-положителни колонии в изследваните проби от фекалиите са наистина STEC, те са анализирани чрез мултиплекс PCR, чрез който се потвърждава тяхната идентичност (резултатите не са показани).

Таблица 36. Разпределение на опитните животни в групи

Група	Еднократно заразяване със STEC на първия ден	Получавали ежедневно пробиотик Лактина
I	-	-
II	+	-
III	+	+

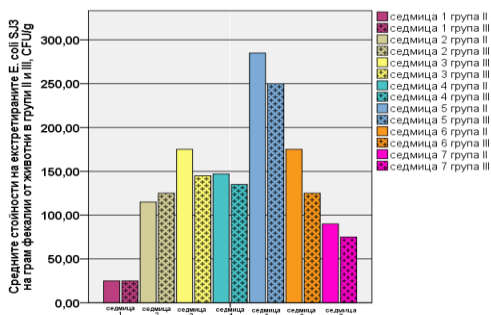
(от 2-ия ден)

Данните за количеството на STEC за тези групи по седмици са представени на Фиг. 22. От фигурата се вижда, че тяхното количество в III група е по-ниско от това в група II, с изключение на 1-та и 2-та седмица, а разликите са статистически достоверни ($P < 0.05$) за третата, петата и седмата седмица от началото на експеримента. Не са наблюдавани нежелани реакции както при животните получавали *E. coli* non-O157 STEC (серотип O11; щам SJ3), така и при тези, които са получавали едновременно със STEC и пробиотичната добавка. Всички животни са клинично здрави през целия 7-седмичен експериментален период и няма данни за диария или промени в текстурата/външния вид на изпражненията.



Фигура 22. Средни стойности за количеството на *E. coli* SJ3 (CFU/g) във фекалиите на животните от съответните групи, получавали щам

Проведените изследвания на щамове, влизащи в добавката Лактина показват, че те имат добра адхезираща способност, което е възможна причина за потискане на *E. coli* SJ3 чрез блокиране на местата за адхезия и по този начин намаляване на тяхното развитие и размножаване, което има за резултат и намаляване на отделяне на техните клетки с изпражненията. Освен това, възможно е пробиотикът да оказва благотворно влияние върху нормалната чревна флора на животните (Фиг. 23), която също да влиза в конкурентни отношения със STEC. Подобни резултати са получени от Hancock *et al.* (2010) при изследване с пробиотичен щам *E. coli* Nissle 1917, като възможна причина за неговото действие се посочва конкуренцията за места за адхезия с патогена в чревната лигавица. Sonnenborn и Schulze (2009) докладват за същия щам, че е способен да индуцира различни имунно-модулаторни дейности, които са насочени както към вродената така и към адаптивната имунна система.



Фигура 23. Брой клетки (cfu/g) на *E. coli* SJ3 във фекалии на животни от II и III група на седмични интервали

Резултатите от нашите изследвания показват, че дневният прием на шестте щама МКБ, влизащи в състава на пробиотичната добавка Лактина е в състояние да намали значително отделянето на *E. coli* SJ3 с фекалиите на третираните животни. Това наблюдение е в съответствие с резултатите от Lema *et al.* (2001), които са тествали различни моно- и многощамови комбинации от пробиотични бактерии. Би могло да се направи заключението, че пробиотичната добавка Лактина притежава потенциал за използване като добавка към храната за намаляване на предаването на патогенния щам *E. coli* SJ3 от овцете към хората. За установяване на точния механизъм на намаляване на количеството на тези патогенни бактерии с фекалиите животните, приемали добавката са необходими допълнителни изследвания.

IV Изводи

1. Генетичният профил на *Enterococcus faecium* NBIMCC 8270 по отношение на 9 гена, кодиращи основни фактори на патогенност при ентерококи го определят като безопасен компонент на пробиотична добавка Лактина и годен за приложение при животни.
2. Щамовете, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина притежават добра *in vitro* устойчивост към условия, симулиращи гастроинтестиналния тракт, по-добра при *Streptococcus thermophilus* NBIMCC 8253 и *Enterococcus faecium* NBIMCC 8270, което ги прави приложими в качеството на добавка към фуражи за животни.
3. Щамовете, компоненти на пробиотична добавка Лактина се характеризират с умерена до висока адхезираща способност (от 2.67 до 65%), което е предпоставка те да колонизират епителните повърхности с възможност да станат част от постоянната микрофлора на гастро-интестиналния тракт.
4. Антимикробната активност на щамовете, влизащи в състава на добавка Лактина се дължи главно на синтезираната от тях млечна киселина и само за три от щамовете (*L. acidophilus* NBIMCC 8242, *L. helveticus* NBIMCC 8269 и *L. lactis* NBIMCC 8764) вероятно и на вещества с друга химична природа.
5. Млечнокиселите бактерии от добавката Лактина притежават видово и щамово специфична чувствителност към изследваните антибиотици и не са резистентни към най-често използваните в животновъдството антибиотици еритромицин, тетрациклин и хлорамфеникол.
6. Всички щамове от добавка Лактина показват генетична стабилност, изследвана с RAPD-PCR анализ, при различни условия на съхранение, което доказва приложимостта на предложените от нас начини за съхранение.
7. Ефективността на пробиотик Лактина като добавка към храната на зайци и пилета е най-висока при прилагането му в доза, съответно 700 и 500 g/t, оценена на базата на телговни показатели, консумация и оползотворяване на фураж и здравословен статус на включените в експеримента животни, което определя тези дози като оптимални.
8. Пробиотична добавка Лактина, добавяна в оптимална, десет – и стократно по-висока доза към фуража на зайци и пилета се понася добре и не оказва неблагоприятно влияние, оценено по телговни показатели, консумация и оползотворяване на фураж, кланичен анализ и здравословен статус на включените в експериментите животни.

9. Приемът на пробиотичната добавка Лактина от овце води до потискане на развитието на *E. coli* non-O157 STEC щам SJ3 в условия *in vivo* и има за резултат намаляване на количеството на отделените клетки с фекалиите на експерименталните животни.

V Приноси

1. За първи път се прави *in vitro* оценка на основни функционални характеристики (транзитна толерантност в условия, симулиращи гастроинтестинален тракт, адхезионна способност, антимикробна активност, чувствителност към антибиотици), както и оценка на генетичната стабилност на щамовете, влизащи в състава на пробиотична добавка Лактина при различни начини на съхранение.
2. Получени са резултати, доказващи че *Enterococcus faecium* NBIMCC 8270 е чувствителен към клинично значими антибиотици и не съдържа маркерни гени, типични за щамове на вида, отговорни за предизвикването на вътреболнични инфекции. Тези данни допринесоха за промяна на критериите на Европейската агенция по безопасност на храните относно безопасността на вида *E. faecium*.
3. Допълнена е информацията за биологичния ефект на пробиотик Лактина в условия *in vivo* и за първи път се предоставя информация за поносимостта на различни дози от него при два вида експериментални животни (зайци и пилета), оценена по голям брой показатели, което е база за разширяване на възможностите за неговото приложение.
4. За първи път се установява потискащ ефект на пробиотик Лактина върху *E. coli* non-O157:H7 STEC при овце, което допълва спектъра на неговото биологично действие и приложение.

VI. Научни публикации и презентации във връзка с дисертацията

Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N., Karaivanova, E. 2014. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1):84–91.

Karapetkov N, Georgieva R, Rumyan N, Karaivanova E. 2011. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. *Beneficial Microbes*, 2(4):335–9.

Rigobelo, E.C., Ávila, F. A., Karapetkov, N. 2013. Strategies to reduce the shedding of *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and non-O157:H7 using probiotics strains into animals. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex Research Center, Badajoz, Spain.

Rigobelo, E.C., Karapetkov, N., Maestá, S., Ávila, F., McIntosh, D. 2014. Use of probiotics to reduce faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. *Beneficial Microbes*, 6(1):1–8.

Сурджиjsка, С., Ангелова, Л., Ценков, Ц., Македонски, И., Карапетков, Н. 2015. Ефект от добавката на пробиотик Лактина към комбинираните фуражи за пилета бройлери. *Птицевъдство*, 4, 11–17.

Карапетков, Н. 2015. Пробиотикът Лактина при храненето на пилета бройлери. *Птицевъдство*, 5, 11–15.

Karapetkov N, Georgieva R, Surdjijska, S. 2017. The effect of adding a mixture of probiotic strains to the feed of rabbits on their health and performance status. *Journal of Animal Husbandry*. In press.

Доклад на XXXVII Международна конференция „Птицевъдство 2015“, Хасково, 6-8.10.2015. Заглавие на научното съобщение: „Зоотехническа пробиотична добавка Лактина за пилета бройлери от лиофилизирани млечно-кисели бактерии“.

Лекция на тема „Стартерни култури за кисело мляко – селекция на природни щамове за участие в пробиотици и закваски“. Пловдив, 02.2015, Университет по хранителни технологии, Пловдив.

Постер презентация на международна конференция “Prebiotics & Probiotics for Human Health”, София, 18.04.2011. Заглавие на постера: Study of the Bacterial Resistance to Antibiotics of Miscellaneous Lactic Acid Bacteria Probiotic Strains.

Постер презентация на научно-практическа конференция „110 години от откриването на д-р Стамен Григоров – *Lactobacillus bulgaricus* Grigoroff“, София, 26.06.2015. Заглавие на постера: Beneficial properties of *Lactobacillus bulgaricus* as a part of probiotic additive for animal feeding.

Постер презентация на международна конференция “International Probiotics Conference IPC”, Budapest, 2016. Заглавие на постера: Efficacy and Tolerance of Six Lactic Acid Bacteria Strains in Trials with Rabbits.