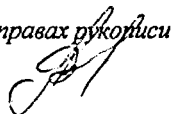


На правах рукописи



БАРЫШНИКОВ СЕРГЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

**СНИЖЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ТУШЕК ЦЫПЛЯТ-
БРОЙЛЕРОВ САЛЬМОНЕЛЛАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КОРМЕ
ПРОБИОТИКА LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS КБ-05**



003480343

**16.00.06 - ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и ветеринарно-санитар-
ная экспертиза**

22 ОКТ 2009

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Москва – 2009

Работа выполнена в Государственном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте птицеперерабатывающей промышленности (ГУ ВНИИПП РАСХН).

Научный руководитель:

кандидат ветеринарных наук
старший научный сотрудник

Козак Сергей Степанович
(ГУ ВНИИПП)

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук,
профессор

Долгов Виктор Андреевич
(ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

кандидат ветеринарных наук,
профессор

Боровков Михаил Федорович
(ФГОУ ВПО МГАВМиБ
им. К.И. Скрябина)

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии» (ФГОУ ВПО МГУПБ)

Защита состоится 16 ноября 2009 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН (г.23022, Москва, Звенигородское шоссе, д.5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН.

Автореферат разослан 16 10 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Юдина А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Производство мяса птицы сложный процесс, который включает ряд последовательных, зависящих друг от друга этапов - от выращивания родительского стада до убоя и переработки птицы. Если птица получает корм, содержащий микробные загрязнители (сальмонеллы), то такая птица является сальмонеллоносителем. Следовательно, высока вероятность перекрестной контаминации тушек на протяжении остальных стадий переработки. Убой и переработка птицы являются завершающими стадиями получения мяса птицы. Для получения безопасной продукции чрезвычайно важным является соблюдение гигиенических требований в процессе первичной переработки птицы: от предубойной выдержки до охлаждения или замораживания готовой продукции и поставки ее потребителю [Каврук Л.С. 2006; Козак С.С. 2007; Бутко М.П. 2007; Фисинин В.И. 2008].

В последние годы значительно сокращен список терапевтических препаратов, антибиотиков, антипротозойных препаратов, разрешенных для использования в птицеводстве [McMullin P., 2003]. На конечном этапе выращивания из рациона птицы исключают антибактериальные средства. В этот период в кишечнике может активизироваться условно-патогенная и патогенная микрофлора. Это приводит, с одной стороны, к повышенному отходу птицы, с другой - патогенная микрофлора из кишечника в процессе первичной переработки птицы может попадать на поверхность тушек и в готовую продукцию [Бутко М.П. 2005; Долгов В.А. 2005; Козак С.С. 2007; Найденский М.С. 2007]

Ужесточение требований к экологической безопасности продукции животноводства заставило пересмотреть многие методические подходы к вопросам оптимизации контроля над эпизоотическим процессом болезней, возбудителями которых является условно патогенная микрофлора, и признать необходимость разработки нового поколения экологически безопасных препаратов, способных занять свое место в системе мероприятий по обеспечению биологической защиты животных [Каврук Л.С. 2006; Козак С.С. 2007; Бессарабов Б.Ф. 2007; Кононенко А.Б. 2007; Фисинин В.И. 2008; Garlson H., 1982; Imrey C.S. et al., 1982; Nurmi E.V. et al., 1987; Mulder R.W., 1991; Heimbürger D.C. et al., 1994; Me Far-

land L.I. et al., 1995; Maruta Kiyoshi., 1999].

Наиболее полно этим требованиям могут отвечать пробиотические препараты, в состав которых входят живые бактерии из числа основных представителей нормального кишечного биоценоза, такие, как лактобациллы, бифидобактерии, стрептококки [Петровская В.Г. и др., 1976; Вильшанская Ф.Л., 1987; Грачева Н.М. и др., 1996; Неклюдов А.Д. и др., 1998; Малик Н.И., 2002; Lilley D.M. et al., 1965; Senna V. et al., 1984; Mc Farland L.V. 1994].

Потребность в пробиотиках привела к тому, что для лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней животных и птицы стали использовать препараты медицинского назначения. В связи с этим, ряд отечественных и зарубежных ученых считают, что разработка новых пробиотиков является актуальной задачей, так как данные препараты представляют собой отдельный класс биологических препаратов, успешно применяемых вместо антибиотиков [Панин А.С. и др., 1999; Малик Н.И., 2002].

Поэтому проведение исследований с целью снижения вероятности контаминации тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами с использованием в корме пробиотиков является актуальным.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы - разработка способа снижения контаминации поверхности тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами с использованием в корме пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05.

Поставленная цель достигалась решением следующих задач:

- Провести мониторинг по выделению штаммов сальмонелл в кормах, птичниках, на поверхности тушек цыплят-бройлеров в убойных цехах птицефабрик, а также в мясе птицы и продуктах его переработки.
- Выделить из содержимого желудочно-кишечного тракта здоровых цыплят-бройлеров штамм микроба-антагониста, обладающего антагонистическими свойствами по отношению к сальмонеллам.
- Определить видовую принадлежность данного штамма и изучить его морфологические, культуральные, биохимические и патогенные свойства, установить срок персистенции в желудочно-кишечном тракте цыплят-бройлеров.

- Разработать способ применения пробиотика на основе штамма *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 и депонировать выделенный штамм микроорганизма, обладающий пробиотическими свойствами.

- Изучить органолептические, биохимические и микробиологические показатели мяса, полученного от цыплят-бройлеров, получавших с кормом пробиотик *Lactobacillus acidophilus* КБ-05/

- Разработать методические рекомендации по использованию в корме пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 для снижения контаминации тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами.

Научная новизна.

Изучены штаммы сальмонелл, выделенные при исследовании комбикормов, птичников, с поверхности тушек цыплят-бройлеров в убойных цехах птицефабрик, а также из мяса птицы и полуфабрикатов.

Изучены морфологические, культуральные, биохимические, патогенные и антагонистические свойства выделенного штамма микроорганизма *Lactobacillus acidophilus* КБ-05, а также определены оптимальные среды для его культивирования.

Установлена длительность нахождения штамма *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 в желудочно-кишечном тракте цыплят-бройлеров.

Выделены спонтанные мутанты пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus* КБ-05.

Изучено антагонистическое влияние выделенного штамма *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 на элиминацию сальмонелл из кишечника цыплят-бройлеров.

Изучены органолептические, микробиологические и биохимические показатели мяса цыплят-бройлеров, получавших с кормом пробиотик *Lactobacillus acidophilus* КБ-05

Практическая ценность работы.

Разработан биологический способ снижения контаминации сальмонеллами поверхности тушек цыплят-бройлеров с использованием пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05.

На основании проведенных исследований разработаны методические рекомендации «Использование в корме пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 для снижения контаминации тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами», утвержденные Отделением ветеринарной медицины РАСХН 18.05.2009 года.

Выделенный штамм *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 депонирован в ФГУ «ВГНКИ».

Апробация работы:

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Международной научно-практической конференции «Новые мировые тенденции в производстве продуктов из мяса птицы и яиц» (Ржавки, 2006); 9-ой Международной конференции, посвященной памяти В.М. Горбатова «Интеграция в мясную промышленность России современных методов управления качеством и прослеживаемости» (Москва, 2006); научно-практической конференции «Интеграция фундаментальных и прикладных исследований - основа развития современных аграрно-пищевых технологий» (Углич, 2007).

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Результаты мониторинга по выделению сальмонелл в кормах, оборудовании, смывах с тушек цыплят-бройлеров, в мясе птицы и продуктах его переработки.

2. Результаты поиска и выделения из содержимого желудочно-кишечного тракта здоровых цыплят-бройлеров штамма микроорганизма-пробиотика, обладающего антагонистическими свойствами по отношению к сальмонеллам; его идентификация по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам.

3. Снижение контаминации сальмонеллами поверхности тушек цыплят-бройлеров при использовании в составе корма пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 за две недели до убоя.

4. Органолептические, биохимические и микробиологические показатели мяса цыплят-бройлеров, получавших с кормом пробиотик *Lactobacillus acidophilus* КБ-05.

Публикации. По результатам исследований опубликовано 5 печатных работ, в том числе в журнале, рекомендованном ВАК.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 189 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы, приложений. Работа содержит 21 таблицу, 1 рисунок, 30 фотографий. Список использованной литературы включает в себя 333 источников, в том числе 151 зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Диссертационная работа выполнена в лаборатории санитарно-гигиенической оценки сырья и продуктов ГУ ВНИИ птицеперерабатывающей промышленности на основании плана научно-исследовательских работ в период с 2000 по 2007 г.г. и является частью тем №№ 03.01.11.03 и 03.03.16

В качестве объектов исследований были выбраны: комбикорма, цыплята-бройлеры, технологическое оборудование по содержанию живой птицы (цыплят-бройлеров), помет, оборудование линий убойного цеха - от навешивания, оглушения до упаковки готовой продукции, тушки цыплят-бройлеров. Поиск микробов-антагонистов осуществляли с различных объектов; из помёта здоровых цыплят-бройлеров, содержимого желудочно-кишечного тракта, слепых отростков и т.д.

При выделении и идентификации микроорганизмов пользовались следующими нормативными документами: ГОСТ 26668-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 7702.2.0-95 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям», ГОСТ 7702.2.3-93 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Метод выявления сальмонелл», ГОСТ 30726-2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*», Международный стандарт ISO

3665 ИСО «Мясо и мясные продукты. Микробиологическое исследование на сальмонеллез. Арбитражный метод», ГОСТ 25311-82 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды», Получение общего смывного раствора проводили согласно «Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях» (М., 1990). При изучении биохимических свойств и идентификации полученных штаммов использовали API-системы Iapi® 50 CH и Iapi® 20E (bioMerieux, Франция). Установление антагонистических свойств по отношению к сальмонеллам проводили на жидких и твердых питательных средах по Сотникову Р.П. (1999). Определение патогенных свойств проводили на белых мышках, суточных цыплятах-бройлерах. Все опыты ставили с числом повторностей (не менее 3-х), обеспечивающих получение воспроизводимых и достоверных результатов. Статистическую обработку полученных данных, построение необходимых графиков и диаграмм проводили с использованием компьютерной программы Excel. Достоверность статистической разницы между средними величинами определяли по разностному методу Стьюдента-Фишера.

Результаты исследований

1. Мониторинг по выделению штаммов сальмонелл в кормах, птичниках, на поверхности тушек при переработке цыплят-бройлеров и в птицепродуктах.

В начале работы исследовали комбикорма, предназначенные для кормления цыплят-бройлеров в возрасте 1-14 дней и старше с целью выделения сальмонелл. Было исследовано 39 партий комбикормов. Комбикорма, предназначенные для кормления цыплят-бройлеров до 14-дневного возраста, содержали сальмонеллы в 18,75% исследованных проб; комбикорма, предназначенные для кормления цыплят-бройлеров старше 14-дневного возраста, содержали сальмонеллы в 19,05% исследованных проб.

Исследованиями установлено, что основным источником заражения сальмонеллами суточных цыплят-бройлеров на производственно-экспериментальной птицефабрике являются комбикорма. Выделены и идентифицированы следующие штаммы: *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. Установили, что *S. enteritidis* в комбикормах, предназначенных для кормления цыплят-бройлеров как до, так и старше 14-дневного возраста выделяется в два раза чаще по сравнению с *S. typhimurium*.

При проведении мониторинга по выделению сальмонелл в птичниках для напольного выращивания цыплят-бройлеров исследованию подвергали смывы с кормушек, подстилку, а также содержимое желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров. Установлено, что из 24 смывов с кормушек, предназначенных для кормления цыплят-бройлеров, сальмонеллы выделены в двух, что составило 8,33% случаев исследований. Из 24 проб подстилки сальмонеллы выделены в четырех, что составило 16,66% случаев исследований. Из 24 исследованных проб помета сальмонеллы выделены в пяти, что составило 20,83% случаев исследований. В смывах с поилок сальмонеллы не обнаружены. В подстилке и содержимом желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров выделили *S. enteritidis* и *S. typhimurium*. В смывах с кормушек выделили *S. enteritidis*.

Проводили также патологоанатомические и бактериологические исследования павших цыплят при сальмонеллезе. При наружном осмотре и вскрытии полостей обнаружена картина, характерная для сальмонеллезов. Из паренхиматозных органов и желудочно-кишечного тракта цыпленка при бактериологическом исследовании выделена *S. enteritidis*.

При убое цыплят-бройлеров из обследованных птичников исследовали содержимое слепых отростков, а также смывы с поверхности тушек на наличие сальмонелл. Отбор проб проводили методом случайной выборки на участке потрошения. Смывы с поверхности тушек проводили после прохождения тушек цыплят-бройлеров ванны охлаждения в начале и через 2,5 часа работы конвейера. В результате проведенных исследований установлено, что в смывах с поверхности тушек цыплят-бройлеров выделены те же штаммы сальмонелл, что и в содержимом слепых отростков и смывах с ног: *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. В

процессе работы конвейера возрастает вероятность контаминации поверхности тушек сальмонеллами: в начале смены в смывах с поверхности тушек сальмонеллы выделяли в 4,17%, а через 2,5 часов работы конвейера - в 16,66%.

Проведены исследования продуктов из мяса птиц, предназначенных для реализации в торговой сети, на наличие сальмонелл. Всего исследовано 887 образцов. Из 887 проб мяса птицы и продуктов его переработки сальмонеллы выделены в 148 случаях исследования, что составило 16,7%. В том числе *S. enteritidis* 71 случай - 47,96% от числа выявлений, *S. typhimurium* 45 случаев - 30,41%, *S. budapest* 8 случаев - 5,41%, *S. cholerae suis* 8 случаев - 5,41%, *S. gallinarum-pullorum* 7 случаев - 4,73%, *S. hato* 3 случая - 2,03%, *S. banana* 2 случая - 1,35%, *S. georgia* 2 случая - 1,35%, *S. banalia* 2 случая - 1,35%. Из представленных данных видно, что преобладающими видами сальмонелл, выделяемых из мяса птицы и продуктов его переработки, являются *S. enteritidis* и *S. typhimurium*.

Полученные результаты исследований позволяют сделать вывод о том, что одной из наиболее вероятных причин контаминации поверхности цыплят-бройлеров сальмонеллами является используемый в рационе комбикорм.

Таким образом, проблема обсеменения поверхности тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами имеет место и необходима, кроме проведения микробиологического контроля за качеством кормов, разработка способа профилактики и снижения контаминации поверхности тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами.

2. Изучение патогенных свойств выделенных видов сальмонелл

На первом этапе исследований патогенность сальмонелл была изучена на куриных эмбрионах. Из 20 тестируемых сероваров сальмонелл патогенность для куриных эмбрионов 8-дневного срока инкубации установлена у *S. enteritidis* (выделена из смыва с тушек птицы), *S. gallinarum-pullorum* (выделена из мяса механической обвалки), *S. budapest* (выделена из смыва с тушек птицы), *S. typhimurium* и *S. hato* (выделены из смыва с тушек птицы).

На втором этапе исследований патогенность тестируемых сальмонелл была изучена на белых мышах. Изученные виды и штаммы сальмонелл, как музейные (*S. enteritidis* №64/39, *S. typhimurium* №55, *S. gallinarum-pullorum* №

24/55), так и полевые (*S. typhimurium*, *S. enteritidis* - выделены из смыва с тушек цыплят; *S. gallinarum-pullorum* - выделена из мяса птицы механической обвалки) патогенны для белых мышей в дозах от 5 тыс. до 50 млн. МК. Следует отметить, что патогенность полевых штаммов сальмонелл выше, чем музейных. Кроме того, установлены и минимальные дозы - 5 тыс. микробных клеток, которые вызвали гибель белых мышей.

При вскрытии у павших мышей отмечали патологоанатомическую картину, характерную для сальмонеллезоз. Из паренхиматозных органов павших мышей при бактериологическом исследовании выделены культуры, которые использовались для заражения животных (*S. enteritidis* и *S. typhimurium*).

Таким образом, на поверхности тушек цыплят-бройлеров, мясе птицы и продуктах его переработки присутствуют штаммы сальмонелл, патогенные как для куриных эмбрионов, так и для белых мышей. Эти штаммы использовали в дальнейших исследованиях по определению наличия пробиотических свойств у выделенных культур *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 и *Escherichia coli*.

3. Выделение пробиотических культур из содержимого кишечника цыплят-бройлеров

При выделении пробиотических культур использовали содержимое желудочно-кишечного тракта. От клинически здоровых цыплят-бройлеров 24-дневного возраста из разных помещений, индивидуально, с соблюдением стерильности брали помет в стерильную посуду. Делали посев нативных проб помета на две среды - Китт-Тарроцци и МПБ с глюкозой от каждого цыпленка в отдельности, термостатировали при 37°C и через каждые 18-24 часа пересеивали на те же среды и твердые диагностические среды согласно указанным методикам. У полученных таким образом культур проверяли антагонистические свойства по отношению к музейным и полевым штаммам сальмонелл - *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. budapest*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. hato*, *S. georgia*, *S. banalia*, *S. banapa*. В результате работы было выделено четыре наиболее подходящих, на наш взгляд, культуры 2А, 2+, 9А и КБ-05, у которых были установлены пробиотические свойства по отношению к сальмонеллам, с кото-

рыми и проводилась дальнейшая работа. Антагонистическая активность исследованных культур пробиотиков была особенно высока у штаммов КБ-05 и 2А - от 10 до 20 мм. Были изучены культуральные, морфологические и биохимические свойства выделенных штаммов.

Культуральные свойства штамма 2А. На мясо-пептоном агаре колонии правильной S- формы, опалово-мутноватые, слабовыпуклые, влажные, с ровным краем и блестящей поверхностью, до 2-3 мм в диаметре. На висмут-сульфитном агаре (ВСА) колонии черного цвета (без металлического блеска и потемнения среды под колонией), гладкие, блестящие, сочные, круглые, слегка выпуклые, до 2-3 мм в диаметре. На среде Эндо колонии ярко малинового цвета, гладкие, блестящие, влажные, круглые, слегка выпуклые, до 2-3 мм в диаметре. На среде Левина (с добавлением 0,034% ТФТХ) колонии темно-фиолетового цвета, гладкие, блестящие, влажные, круглые, слегка выпуклые, до 2-3 мм в диаметре. В мазках, окрашенных по Граму, культура представлена грамтрицательными палочками 1,1-1,5 x 2,0-6,0 мкм, встречаются отдельно или в парах, спор не образуют, подвижны.

Культуральные свойства штамма 2+. На мясо-пептоном агаре (МПА) колонии молочно-белого цвета, гладкие, блестящие, влажные, круглые, слегка выпуклые, до 2-3 мм в диаметре. На висмут-сульфитном агаре (ВСА) колонии черного цвета, без металлического блеска и потемнения среды под колонией, гладкие, блестящие, влажные, круглые, слегка выпуклые, до 2-3 мм в диаметре. На среде Эндо колонии ярко малинового цвета, гладкие, блестящие, влажные, круглые, слегка выпуклые, до 2-3 мм в диаметре. На среде Левина (с добавлением 0,034% ТФТХ) колонии светло-фиолетового и розового цвета, с более темным центром, гладкие, блестящие, влажные, круглые, слегка выпуклые, до 3-5 мм в диаметре. В мазках, окрашенных по Граму, культура представлена грамтрицательными палочками, 0,9-1,4 x 1,9-5,9 мкм, встречаются отдельно, в парах или в виде небольших колоний, спор не образуют, подвижны.

Биохимические свойства штаммов 2А и 2+. Штамм 2А подвижен, ферментирует индол, лизин, 3-галактозидазу, трегалозу, манитол, сорбитол, мелибиозу, галактозу, свертывает молоко; не расщепляет сероводород, не ферменти-

рует орнитин, уреазу, аргинин, цитрат по Симонсу, малонат, фенилаланин, инозитол, адонитол, целлобиозу, сахарозу, ацетонин, эскулин, рамнозу, раффинозу, дульцитол, дульцит, не разжижает желатин, на бульоне с глюкозой pH 6.0. Штамм 2+ слабоподвижен, ферментирует индол, лизин, орнитин, 3-галактозидазу, сахарозу, трегалозу, маннитол, сорбитол, рамнозу, мелибиозу, раффинозу, галактозу, свертывает молоко; не расщепляет сероводород, не ферментирует уреазу, аргинин, цитрат по Симонсу, малонат, фенилаланин, инозитол, адонитол, целлобиозу, ацетонин, эскулин, дульцитол, дульцит, не разжижает желатин, на бульоне с глюкозой pH 6.0. Описанные выше штаммы 2А и 2+ по определителю Берги относятся к Семейству кишечных бактерий *Enterobacteriaceae*, род *Echerichieae*, вид *Echerichia coli*. В соответствии с руководством производителя API-системы Iapi® 20E (bioMerieux, Франция) и по культурально-морфологическим признакам изучаемые штаммы определены, как относящиеся к виду *Escherichia coli*.

Культуральные свойства штамма 9А. Рост на среде Китт-Тарощи характеризуется помутнением среды в первые 24–48 часов, затем муть оседает в виде обильного осадка. Рост на обезжиренном молоке характеризуется сворачиванием молока. Рост на ПЖ MRS-агаре - колонии в виде теннисной ракетки. На MRS-агаре поверхностные колонии мелкие, округлые, S-формы, размером 1-3 мм, гладкие, блестящие, серо-белого цвета, со сферической поверхностью, глубинные колонии могут быть темными, желтовато-бурыми, в виде чечевичного зерна. Температурная граница роста составляет 30–40°C, оптимум 37–38°C, оптимальный pH составляет 5,5–6,2.

В мазках, окрашенных по Грамму - длинные грамположительные палочки, 0,7-1,1x2-4 мкм, концы прямоугольные, слегка закруглены, располагающиеся в мазках одиночно, попарно или в коротких цепочках. Неподвижны, спор не образуют. Хорошо растут на MRS -агаре при температуре 38°C в течение 24–48ч., образуют мелкие колонии округлой формы, гладкие, с ровными краями, полупрозрачные или непрозрачные, блестящие. При удалении колоний иглой или бактериологической петлей обнаруживаются волокна слизи. При росте на MRS-бульоне - умеренное помутнение с выпадением на дно хлопьевидного осадка.

На МПБ культура растет слабо в виде незначительного помутнения и мелких хлопьев, фиксированных на стенке пробирки. На МПА рост слабый в виде мелких блестящих, прозрачных, едва видимых колоний. Обезжиренное молоко свертывается через 10-12 часов, образуя жидкий сгусток без разрывов и пузырьков газа. Предельная кислотность 220°Т. На среде Китт-Тароцци растет в виде значительного помутнения.

Культуральные свойства штамма КБ-05. Рост на среде Китт-Тароцци характеризуется помутнением среды в первые 24-48 часов, затем муть оседает в виде обильного осадка. При культивировании штамма КБ-05 на обезжиренном молоке образуется однородный плотный сгусток с приятным кисломолочным запахом и вкусом. На полужидком MRS-агаре колонии в виде веретена правильной формы. На плотных питательных средах формируются округлые мелкие, размером 1-3 мм, гладкие, блестящие колонии серо-белого цвета с выпуклой сферической поверхностью. Глубинные колонии могут быть темными, желтовато-бурыми, в виде чечевичного зерна. Температурная граница роста составляет 30-40°С, оптимум 37-38°С, оптимальный pH составляет 5,5-6,2.

В мазках, окрашенных по Грамму – длинные, прямые грамположительные палочки, 0,5-0,6х4-15 мкм, с закругленными концами, располагающиеся в мазках одиночно, попарно или в коротких цепочках, встречаются изогнутые, неподвижны, спор и капсул не образуют. Хорошо растут на MRS -агаре при температуре 38 °С в течение 24-48 ч., образуют мелкие колонии округлой формы, гладкие, с ровными краями, полупрозрачные или непрозрачные, блестящие. При удалении колоний иглой или бактериологической петлей обнаруживаются волокна слизи. При росте на MRS-бульоне - умеренное помутнение с выпадением на дно хлопьевидного осадка. На МПБ культура растет слабо в виде незначительного помутнения и мелких хлопьев. На МПА рост слабый в виде мелких блестящих, прозрачных, едва видимых колоний. Обезжиренное молоко свертывается через 10-12 часов, образуя плотный сгусток без разрывов и пузырьков газа. Предельная кислотность 220 °Т. На среде Китт-Тароцци растет в виде значительного помутнения.

Биохимические свойства штаммов КБ-05 и 9А. Штамм КБ-05 ферментирует амигдалин, целлобиозу, эскулин, фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, маннозу, салицин, часто раффинозу, мелибиозу, трегалозу, декстрин, не ферментирует арабинозу, глюконат, маннит, мелецитозу, рамнозу, рибозу, сорбит, ксилозу, желатин не разжижает, казеин не расщепляет, индол и H_2S не образует. Штамм 9А ферментирует фруктозу, галактозу, глюкозу, лактозу, не ферментирует амигдалин, арабинозу, целлобиозу, эскулин, глюконат, мальтозу, маннит, маннозу, мелецитозу, мелибиозу, раффинозу, рамнозу, рибозу, салицин, сорбит, сахарозу, трегалозу, ксилозу, желатин не разжижает, казеин не расщепляет, индол и H_2S не образует.

Данные штаммы по определителю Берги относятся к семейству *Lactobacillaceae*, род *Lactobacillus*. В соответствии с руководством производителя тест АРІ-систем Iari[®] 50 СН и Iari[®] 20Е (bioMerieux, Франция) и по культурально-морфологическим признакам изученные штаммы определены, как относящиеся к виду *Lactobacillus acidophilus*.

4. Определение антагонистических свойств у выделенных культур *E. coli* (2А и 2+) и *Lactobacillus acidophilus* (9А и КБ-05)

по отношению к сальмонеллам

Проведены исследования по определению у выделенных культур наличия антагонистических свойств по отношению к сальмонеллам. Испытанные культуры в разной степени обладают антагонистическими свойствами по отношению к полевым штаммам сальмонелл.

У штаммов *L. acidophilus* 9А и *E. coli* 2+ установлена относительно высокая антагонистическая активность по отношению к музейным штаммам сальмонелл, однако их антагонистическая активность к полевым штаммам *S. enteritidis* и *S. typhimurium* относительно невелика - от 4 до 9 мм., а в некоторых случаях у *E. coli* штамм 2+ антагонистическая активность по отношению к сальмонеллам *S. enteritidis* и *S. typhimurium* не была установлена. У штаммов *L. acidophilus* КБ-05 и *E. coli* 2А установлена высокая антагонистическая активность к исследованным полевым штаммам сальмонелл - от 12 до 19 мм.

5. Определение патогенности выделенных штаммов *E. coli* (2А и 2+) и *L. acidophilus* (9А и КБ-05) in vivo

Определение патогенности выделенных штаммов проводили на белых мышах и цыплятах бройлерах. После внутрибрюшинного введения белым мышам культур *E. coli* штаммы 2А и 2+, *L. acidophilus* штаммы 9А и КБ-05 в дозе по 500 млн. микробных клеток патогенных свойств у изучаемых культур не установлено. После внутрибрюшинного введения цыплятам-бройлерам культур *E. coli* штаммы 2А и 2+, *L. acidophilus* штаммы 9А и КБ-05 в дозе 2000-3600 млн. микробных клеток каждой культуры патогенных свойств у изучаемых культур не установлено.

6. Выделение спонтанных мутантов штаммов *E. coli* (2А и 2+) и *L. acidophilus* (9А и КБ-05)

Высевом штаммов культур *L. acidophilus* (9А и КБ-05) и *E. coli* (2А и 2+) на питательные среды с антибиотиками стрептомицином, рифампицином и налидиксовой кислотой в концентрации 50 мкг/мл была установлена исходная устойчивость этих штаммов. Штаммы *E. coli* 2А и 2+ устойчивы к указанной концентрации стрептомицина, но при этом вырастает не вся засеянная популяция; кроме того, у культур появляется мукоидный фенотип. По-видимому, устойчивость обусловлена плазмидным или транспозонным фактором, обеспечивающим частичную устойчивость при данной концентрации антибиотика. Рекомендуемая концентрация для селективного выращивания этих двух штаммов - 25-30 мкг/мл стрептомицина в среде. Штамм *L. acidophilus* 9А устойчив к концентрации 50 мкг/мл рифампицина в среде, а штамм *L. acidophilus* КБ-05 - 50 мкг/мл налидиксовой кислоты. Из штаммов культур *E. coli* 2А, 2+ и *L. acidophilus* КБ-05 выделены независимые спонтанные рифампициноустойчивые мутанты. Они способны расти на среде, содержащей до 100 мкг/мл антибиотика: рекомендуемая концентрация - 50-75 мкг/мл рифампицина. Из штаммов культур *E. coli* 2А, 2+ и *L. acidophilus* 9А получены независимые спонтанные мутанты, резистентные к налидиксовой кислоте. Рекомендуемая концентрация этого антибиотика - 25-30 мкг/мл, хотя мутанты способны к росту на среде, содержащей

до 50 мкг/мл налидиксовой кислоты. Все обнаруженные мутанты спонтанной природы получены без каких-либо дополнительных воздействий на исходные культуры, что должно минимально сказываться на природных свойствах представленных штаммов.

7. Установление длительности нахождения *L. acidophilus* штамм КБ-05 и *E. coli* штамм 2+ в кишечнике цыплят-бройлеров

В связи со сравнительно невысокой антагонистической активностью штаммов *L. acidophilus* 9А и *E. coli* 2+ дальнейшую работу проводили со штаммами *L. acidophilus* КБ-05 и *E. coli* 2А. Культуру пробиотика *E. coli* 2А выращивали на 1% - ных растворах пептона или гидролизата, культуру *L. acidophilus* КБ-05 выращивали на MRS-бульоне. Количество микробных клеток в 1 мл среды определяли по стандарту мутности, либо, для более точного результата, методом посева последовательных десятикратных разведений 1 мл полученной бульонной культуры до концентрации не более 30 КОЕ в 1 мл разведения с последующим посевом на MRS-агар и/или Эндо и подсчетом колоний на чашке. Пробиотики выпаивали цыплятам-бройлерам в суточном возрасте (1 раз за опыт) в дозе 500 – 2000 млн. микробных клеток на голову из специальных поилок. Пробы помета отбирали и исследовали на наличие пробиотиков на 2-й, 7-й, 10-й и 15-й дни. У исследованных культур *L. acidophilus* КБ-05 и *E. coli* 2+ хорошо выражены адгезивные свойства. После дачи цыплятам суточного возраста как 500, так и 2000 млн. микробных клеток на одного цыпленка культуры исследуемых пробиотиков выделяли из содержимого кишечника на протяжении 15 дней.

8. Изучение различных питательных сред для культивирования *E. coli* 2А и *L. acidophilus* КБ-05

Проводили исследования различных питательных сред в разных концентрациях: пептон-1%, «Белковый концентрат»-1%, «Белковый концентрат»-3%, «Перо»-5%, «Перо»-10%, «Перо+кровь»-5%, «Перо+кровь»-10%, «Обезжиренное молоко» для культивирования микробной массы. Интенсивность роста культуры *E. coli* штамм 2А на средах с использованием в качестве питательной

основы «Белкового концентрата», «Пера» и «Пера+кровь» сравнима с интенсивностью роста этой культуры на среде с использованием в качестве питательной среды 1%-ного пептона. У культуры *E. coli* штамм 2А на питательной среде с использованием 3% -ного «Белкового концентрата» интенсивность роста была выше по сравнению с 1% -ным пептоном – через 24 ч в 1 мл среды содержалось $1,01 \times 10^{10}$ МК, а через 48 ч - $9,81 \times 10^{10}$ МК. Высокая интенсивность роста культуры *L. acidophilus* КБ-05 установлена на среде с использованием обезжиренного молока. Культивирование культуры *L. acidophilus* КБ-05 возможно и на средах с использованием в качестве питательной основы «Белкового концентрата», «Пера» и «Пера+кровь», однако интенсивность роста на указанных средах ниже по сравнению с обезжиренным молоком.

9. Изучение влияния культур *L. acidophilus* КБ-05 и *E. coli* 2А на элиминацию сальмонелл из кишечника цыплят-бройлеров

В ходе проведения мониторинговых исследований на птицефабриках по выявлению сальмонелл при обнаружении цыплят-бройлеров, являющихся сальмонеллоносителями, такая птица помещалась в отдельные клетки и затем, в случае подтверждения при повторном исследовании, доставлялась в лабораторию санитарно-гигиенической оценки сырья и продуктов Всероссийского научно-исследовательского института птицеперерабатывающей промышленности (ГУ ВНИИПП). Цыплята-бройлеры сальмонеллоносители были разделены на группы. Каждой группе отдельно с кормом скармливали по 500 и 2000 млн. МК пробиотиков *L. acidophilus* КБ-05 и/или *E. coli* 2А. На второй после дачи пробиотиков и последующие дни исследовали помет на наличие сальмонелл по общепринятым методикам. В первый день после дачи пробиотиков сальмонеллы были выделены из помета цыплят-бройлеров как в опытных, так и в контрольной группах, что подтверждено посевами на различные питательные среды и в РА с поливалентной сывороткой. В последующие перед убоем 7 и 15 дни сальмонеллы в помёте опытных групп цыплят-бройлеров не обнаружены, тогда как в контрольной группе обнаруживались. После убоя исследовали внутренние органы, содержимое кишечника на наличие сальмонелл. Сальмонеллы в опытных

группах цыплят-бройлеров в содержимом желудочно-кишечного тракта, печени и сердце не обнаружены. В содержимом желудочно-кишечного тракта выделены культуры *L. acidophilus* штамм КБ-05 и/или *E. coli* 2А. В контрольной группе цыплят-бройлеров в содержимом желудочно-кишечного тракта обнаружены сальмонеллы. Таким образом, применение пробиотиков *L. acidophilus* КБ-05 и *E. coli* 2А в корме за 7-15 дней позволяет снизить содержание в желудочно-кишечном тракте сальмонелл. Дальнейшую работу решили проводить с *Lactobacillus acidophilus* КБ-05.

10. Производственные испытания препарата на основе *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 для снижения обсеменения поверхности тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами

На базе ОАО СПП «Гульское» были проведены производственные испытания пробиотического препарата на основе *Lactobacillus acidophilus* КБ-05. Было сформировано 3 группы птицы кросса Иза F-15 (по 3000 голов в группе) - опытная группа №1 (доза пробиотика - 500 млн. микробных клеток), опытная группа №2 (доза пробиотика - 2000 млн. микробных клеток), контрольная группа №3 (пробиотик не давали). Цыплятам-бройлерам опытных групп №№ 1 и 2 за две недели перед убоем выпаивали пробиотик *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 в указанных выше дозах однократно. В убойный цех птицу направляли отдельно по партиям. Исследованию подвергали по 45 тушек от каждой партии. Тушки отбирали методом случайной выборки. Смывы с тушек помещали в изотермические контейнеры и доставляли для исследования в лабораторию ГУ ВНИИПП. При убое цыплят-бройлеров контрольной группы №3 в смывах с тушек в 31,1 % исследований было выявлено присутствие сальмонелл. При убое птицы опытных групп №№1 и 2 сальмонеллы в смывах с тушек выделены соответственно в 6,6 и 2,2% исследований. Таким образом, использование в корме пробиотика на основе молочнокислой бактерии *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 позволяет получить антагонистический эффект в отношении сальмонелл. Применение пробиотика за две недели перед убоем в дозах 500 и 2000 млн. МК на голову снижает

контаминацию поверхности тушек птицы сальмонеллами соответственно на 85 и 95%.

11. Влияние использования в корме пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 на органолептические, биохимические и микробиологические показатели тушек цыплят-бройлеров

Целью данных исследований было выяснить влияние использования в корме пробиотика *L. acidophilus* КБ-05 на органолептические, биохимические и микробиологические показатели тушек цыплят-бройлеров. Для этого примерно через два часа после охлаждения и отбора проб для микробиологических исследований проводили органолептические и биохимические исследования тушек цыплят-бройлеров.

Таблица 1

Влияние использования в корме пробиотика *L. acidophilus* КБ-05 на органолептические показатели тушек цыплят-бройлеров

| Показатели | Тушки цыплят-бройлеров | |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Контрольная | Опытные №№1; 2. |
| 1. Внешний вид и цвет: | | |
| поверхности тушки | сухая, беловато-желтого цвета, с розовым оттенком | сухая, беловато-желтого цвета, с розовым оттенком |
| подкожной и внутренней жировой ткани | желтого цвета | желтого цвета |
| серозной оболочки грудобрюшной полости | влажная, блестящая | влажная, блестящая |
| мышц на разрезе | слегка влажные, не оставляют влажного пятна на фильтровальной бумаге, бледно-розового цвета. | слегка влажные, не оставляют влажного пятна на фильтровальной бумаге, бледно-розового цвета. |
| 2. Микроскопия | следов распада мышечной ткани нет, микрофлора не обнаружена | следов распада мышечной ткани нет, микрофлора не обнаружена |
| 3. Запах | специфический, свойственный свежему мясу птицы | специфический, свойственный свежему мясу птицы |
| 4. Прозрачность и аромат бульона | прозрачный, ароматный | прозрачный, ароматный |

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что использование в корме пробиотика *L. acidophilus* КБ-05 не ухудшает органолептические показатели тушек цыплят-бройлеров. Тушки цыплят-бройлеров, получавших в корме пробиотик *L. acidophilus* КБ-05 в дозе 500 и 2000 млн. МК на 1 голову, не имели постороннего запаха, внешний вид тушек, жировой ткани, серозных оболочек грудно-брюшной полости по сравнению с тушками контрольной группы не изменялся. При органолептической оценке бульона, приготовленного из мяса цыплят-бройлеров опытных и контрольной групп, различий не установлено. При исследовании биохимических показателей существенных отличий между мясом цыплят опытных и контрольных групп не обнаружено (табл. 2).

Таблица 2

Влияние использования в корме пробиотика *L. acidophilus* КБ-05 на биохимические показатели тушек цыплят-бройлеров

| Показатели | Тушки цыплят-бройлеров | | МДУ |
|------------------------------------------------------|------------------------|---------------|------|
| | Контрольная | Опытные №№1,2 | |
| Летучие жирные кислоты (мг КОН/г) | 2,37±0,07 | 2,36±0,06 | 4,5 |
| Перекисное число жира (ммоль активного кислорода/кг) | 1,62±0,10 | 1,7±0,12 | 10,0 |
| Кислотное число жира (мг КОН/г) | 0,75±0,08 | 0,8±0,09 | 1 |
| Реакция на аммиак с реактивом Несслера | отрицательная | отрицательная | |

Тушки цыплят-бройлеров контрольной и опытных групп исследовали на микробиологические показатели согласно СанПиН 2.3.2.1078-01.

Таблица 3

Влияние использования в корме пробиотика *L. acidophilus* КБ-05 на микробиологические показатели тушек цыплят-бройлеров

| Группы цыплят-бройлеров | Микробиологические показатели: | | | |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | КМАФАнМ, КОЕ/г, | Патогенные, в т. ч. сальмонеллы | <i>L. monocytogenes</i> | <i>L. acidophilus</i> КБ-05 |
| Норма | 1×10^4 | не доп. в 25 г | не доп. в 25 г | Не норм. |
| Контрольная | < 10 | Не обнаруж. | Не обнаруж. | Не обнаруж. |
| Опытные | < 10 | Не обнаруж. | Не обнаруж. | Не обнаруж. |

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что использование в корме пробиотика *L. acidophilus* КБ-05 не ухудшает микробиологические показатели тушек цыплят-бройлеров, которые соответствуют требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01.

ВЫВОДЫ

1. При проведении мониторинга установлена частота выявления сальмонелл:

- в комбикормах, предназначенных для кормления цыплят-бройлеров до 14-дневного возраста - 18,75%; в комбикормах, предназначенных для кормления цыплят-бройлеров старше 14-дневного возраста - в 19,05%;

- в птичниках для напольного содержания: смывы с кормушек - 8,33%, подстилка - 16,66%, помет - 20,83%, (выделены штаммы *S. enteritidis* и *S. typhimurium*). В смывах с поилок сальмонеллы не обнаружены;

- в цехе первичной переработки: смывы с поверхности тушек в начале смены - 4,17%, через 2,5 часов - 16,66%; смывы с ног - 16,66%; (выделены штаммы *S. enteritidis* и *S. typhimurium*);

- мясо птицы и продукты его переработки - 16,7% (всего выделено 9 штаммов, из них наиболее часто выделяли штаммы *S. enteritidis* и *S. typhimurium*).

2. Преобладающими штаммами сальмонелл, выделяемыми из птицепродуктов (тушки цыплят-бройлеров, мясо птицы и продукты его переработки), являются *S. enteritidis* и *S. typhimurium* - соответственно 47,96% и 30,41% от всех

случаев выделения. *S. budapest* выделяли в 5,41%, *S. cholerae suis* – в 5,41%, *S. gallinarum-pullorum* – в 4,73%, *S. hato* – в 2,03%, *S. banana* – в 1,35%, *S. georgia* – в 1,35%, *S. banalia* – в 1,35% случаев выделения сальмонелл.

3. У выделенных полевых штаммов сальмонелл установлены патогенные свойства для куриных эмбрионов 8-дневного срока инкубации, а также для белых мышей. Установлена минимальная доза - 5 тыс. микробных клеток, которые вызывали гибель белых мышей.

4. Выделены и определены по биохимическим свойствам, культурально-морфологическим признакам штаммы пробиотиков КБ-05 и 2А как относящиеся соответственно к видам *Lactobacillus acidophilus* и *Escherichia coli*.

5. У штаммов *L. acidophilus* КБ-05 и *Escherichia coli* 2А установлена высокая антагонистическая активность к полевым штаммам сальмонелл - от 12 до 19 мм.

6. Разработан способ применения пробиотика на основе штамма *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 и депонирован выделенный штамм микроорганизма, обладающий пробиотическими свойствами.

7. Применение пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 за две недели перед убоем в дозах 500 и 2000 млн. микробных клеток на одного цыпленка позволяет снизить контаминацию поверхности тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами соответственно на 85 и 95%.

8. Тушки цыплят-бройлеров, получавших в корме пробиотик *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 в дозах 500 и 2000 млн. МК на 1 голову, не имели постороннего запаха, внешний вид тушек, жировой ткани, серозных оболочек грудной брюшной полости по сравнению с тушками контрольной группы не изменялся. При органолептической оценке бульона, приготовленного из мяса цыплят-бройлеров опытных и контрольной групп различий не установлено.

9. Биохимические и микробиологические показатели мяса цыплят-бройлеров опытных групп были в пределах допустимых норм и практически не отличались от таковых контрольной группы.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Выделенный штамм микроорганизма *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 депонирован 05.09.2006 года. Регистрационный номер ВГНКИ - ДЕП 06.09.41

На основании результатов исследований разработан биологический способ снижения контаминации сальмонеллами поверхности тушек цыплят-бройлеров с использованием пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05.

Разработаны методические рекомендации «Использование в корме пробиотика *Lactobacillus acidophilus* КБ-05 для снижения контаминации тушек цыплят-бройлеров сальмонеллами», утвержденные Отделением ветеринарной медицины РАСХН 18.05.2009 года.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Барышников С.А. Новые исследования для птицеводства и птицеперерабатывающей промышленности /С. Козак, С. Барышников // Сфера. – 2003.-№11. - С. 46.
2. Барышников С.А. Применение *Lactobacillus acidophilus* для снижения обсемененности сальмонеллами тушек птицы / Козак С.С., Барышников С.А.// Мат. Межд. научно-практической конференции «Новые мировые тенденции в производстве продуктов из мяса птицы». Ржавки. - 2006. - С. 230-234.
3. Барышников С.А. Использование пробиотика *Lactobacillus acidophilus* для снижения обсемененности сальмонеллами тушек птицы // Сборник докладов 9-й Международной конференции, посвященной памяти В.М. Горбатова «Интеграция в мясную промышленность России современных методов управления качеством и прослеживаемости». - М.: ВНИИМП. 2006. - 178 с.
4. Барышников С.А. Влияние некоторых прижизненных факторов на безопасность мяса птицы. / Козак С.С., Адамов А.Н., Барышников С.А., Федулов А.Е. // Сборник материалов научно-практической конференции. «Интеграция фундаментальных и прикладных исследований - основа развития современных аграрно-пищевых технологий». Углич. - 2007. - С. 149-151.
5. Барышников С.А. Снижение контаминации тушек бройлеров сальмонеллами путем использования в корме пробиотиков / Козак С.С., Барышников С.А. // Птица и птицепродукты. – 2009. - №3. - с.32-34.

ГНУ ВНИИВСГЭ.

123022, г. Москва, Звенигородское ш., 5. Заказ 3.3/1, тираж 80 экз.