

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

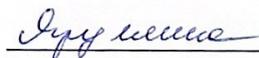
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
РАЗРАБОТКА КОРМОВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА  
НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ  
И ПРИРОДНЫХ АГРОМИНЕРАЛОВ

Обучающийся 2 курса  
группы 01-140-2



О.С. Карасева

Научный руководитель  
канд. биол. наук, доцент



Д.Р. Яруллина

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2023

# СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	
1.1 Природные агроминералы и их применение в животноводстве	7
1.2 Применение молочнокислых бактерий в кормлении и их пробиотические свойства	16
1.3 Кормовые добавки на основе молочнокислых бактерий и агроминералов, используемые в животноводстве	20
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	
2.1 Объекты исследования и материалы	24
2.1.1 Используемые в работе лактобациллы	24
2.1.2 Используемые в работе условно-патогенные микроорганизмы	24
2.1.3 Используемые в работе агроминералы	25
2.2 Культивирование лактобацилл	25
2.2.1 Условия культивирования	25
2.2.2 Получение бесклеточного супернатанта	25
2.3 Микроскопия	26
2.3.1 Атомно-силовая микроскопия	26
2.3.2 Флуоресцентная микроскопия	26
2.4 Микробиологические методы	26
2.4.1 Определение антагонистической активности лактобацилл	26
2.4.2 Определение кислотообразующей активности	27
2.4.3 Анализ биосовместимости штаммов лактобацилл	27
2.4.4 Определение устойчивости лактобацилл к желчи и соляной кислоте	27
2.4.5 MATS метод	27
2.4.6 Анализ автоагрегации лактобацилл	27

2.4.7 Анализ адгезии бактерий на буккальных эпителиоцитах	27
2.4.8 Диско-диффузионный метод оценки антибиотикорезистентности	28
2.4.9 Анализ выживаемости лактобацилл в составе синбиотического препарата	28
2.5 Аналитические методы	28
2.5.1 Определение образования пероксида водорода	28
2.5.2 Оценка антиоксидантной активности с помощью 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила	28
2.5.3 Анализ железо-восстанавливающей активности	29
2.5.4 Анализ способности поглощать свободные радикалы	29
2.5.5 Анализ хелатирующей активности	29
2.5.6 Анализ ингибирования липазы	29
2.5.7 Анализ ингибирования $\alpha$ -глюкозидазы	29
2.5.8 Биохимический анализ мяса перепелов	29
2.6 Биологические методы исследования	29
2.6.1 Условия содержания перепелов	29
2.6.2 Взятие проб и оценка массы прироста	31
2.7 Методы молекулярной биологии	31
2.7.1 Видовая идентификация лактобацилл	31
2.7.2 Полногеномное секвенирование лактобацилл	32
2.7.3 Характеристика микробных сообществ методом секвенирования генов 16S рРНК	33
2.8 Статистическая обработка результатов	35
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ</b>	
3.1 Культуральные свойства <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L	36
3.2 Таксономическая идентификация <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L	36
3.3 Характеристика пробиотических свойств <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L	37
3.3.1 Анализ выживаемости лактобацилл в ЖКТ	37
3.3.2 Адгезивные свойства лактобацилл	38

3.3.3 Антагонизм лактобацилл и его природа	39
3.3.4 Антибиотикорезистентность лактобацилл	42
3.4 Характеристика генома <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L	43
3.5 Конструирование препарата-синбиотика и его характеристика	46
3.5.1 Конструирование препарата-синбиотика и его визуализация	47
3.5.2 Оценка жизнеспособности лактобацилл в составе препарата	48
3.5.3 Влияние иммобилизации на агроминералах на физиологическое состояние лактобацилл	49
3.6 Влияние <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L на сельскохозяйственную птицу (перепелов)	54
3.6.1 Оценка влияния <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L на продуктивность перепелов	54
3.6.2 Оценка влияния <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L на микробный состав кишечника	57
<b>4 ОБСУЖДЕНИЕ</b>	
4.1 Штамм <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L как пробиотическая основа кормовой добавки	61
4.2 Конструирование жидкого синбиотического препарата на основе клеток <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L и агроминералов, и характеристика полученного препарата	66
4.3 Оценка влияния <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> FCa3L, как орального пробиотика, на сельскохозяйственную птицу (перепелов): продуктивность, качество продукции и состав микробного сообщества кишечника	70

## **ВЫВОДЫ**

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

## ВВЕДЕНИЕ

Лактобациллы широко применяются в различных отраслях биотехнологии и пищевой промышленности [Li *et al.*, 2019]. Бактерии этой группы привлекают такими своими качествами, как консервирующие свойства, антагонистическая активность против патогенов и благотворные эффекты на здоровье [Андреева, 2018]. Применение пробиотических добавок в сельском хозяйстве способствует повышению резистентности животных к неблагоприятным факторам внешней среды, улучшению иммунного статуса организма, стимуляции роста и развития молодняка, а также улучшению качества получаемой продукции [Арапова с соавт., 2018; Broom, 2018].

Целью данной работы является разработка синбиотического препарата на основе пробиотического штамма *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L и природных агроминералов.

В соответствии с поставленной целью в работе решаются следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать культуральные и пробиотические свойства *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L;
- 2) Секвенировать геном *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L и провести его молекулярно-генетический и функциональный анализ;
- 3) Разработать синбиотический препарат, в котором клетки *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L иммобилизованы на природных агроминералах;
- 4) Охарактеризовать влияние иммобилизации на агроминералах на жизнеспособность и физиологическое состояние *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L;
- 5) Оценить влияние *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L как кормовой добавки на микробный состав кишечника и продуктивность перепелов.

## ВЫВОДЫ

1) Охарактеризован пробиотический профиль нового изолята из квашеной капусты *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L, включающий выживаемость в пищеварительном тракте, адгезивную, антибактериальную и антиоксидантную активности, биосовместимость с другими пробиотиками и антибиотикорезистентность.

2) Согласно полногеномному секвенированию на платформе Illumina MiSeq, *L. plantarum* FCa3L содержит хромосому размером 3365929 п.н. с 44.3% GC и циклический фаг phiX174 размером 5386 п.н. с 44.7% GC. В геноме обнаружены соответствующие генетические детерминанты адгезивной и антибактериальной активности, биосинтеза биологически активных веществ; не выявлены гены вирулентности, но обнаружен ряд молчащих генов антибиотикорезистентности.

3) Введение в рацион перепелов кормовой пробиотической добавки, представляющей собой биомассу *L. plantarum* FCa3L в питательной среде на основе молочной сыворотки, не оказывало значимого эффекта на массу тушек, продуктивность и биохимические показатели мяса перепелов, но вызвало существенные сдвиги в составе бактериального сообщества тонкой кишки.

4) Разработан способ иммобилизации *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L на агроминералах сапропеле, бентоните и цеолите в питательной среде на основе молочной сыворотки, при котором лактобациллы сохраняют жизнеспособность.

5) Иммобилизация на агроминералах сапропеле, бентоните и цеолите не ингибировала гликолитическую и протеолитическую активности *L. plantarum* FCa3L. Антиоксидантный потенциал полученного препарата-синбиотика и его активность в отношении углеводного и липидного обмена хозяина зависела от особенностей агроминералов.