



**СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
ЗЕМЕДЕЛСКИ ИНСТИТУТ - СТАРА ЗАГОРА**

Научен отдел “ Развъждане и технологии в говедовъдството“

ГЕОРГИ СТЕФАНОВ ЧАВДАРОВ

**„Влиянието на пробиотик „Зоовит“ върху основните
качествени показатели и технологични свойства на
млякото от крави от породата Холщайн“**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за придобиване на образователна
и научна степен „Доктор“**

Професионално направление: 6.3. Животновъдство

Област на висше образование:

6. Аграрни науки и ветеринарна медицина

Докторска програма: „Говедовъдство и биволовъдство“

Научни ръководители:

Акад. Мария Ангелова Балтаджиева

Проф. д-р Стайка Станева Лалева

Рецензенти:

Проф. дн Живка Герговска

Проф. д-р Петър Панайотов

СТАРА ЗАГОРА

2023

Сърдечни благодарности на акад. Мария Балтаджиева за напътствията, упоритата работа и оказаната подкрепа при разработването на дисертационния труд. Благодарности изказвам и на проф. д-р Стайка Лалева и на останалите колеги от Земеделски институт – Ст. Загора за оказаното съдействие. Изказвам своята благодарност и на членовете на научното жури за обективните и полезни препоръки. Благодарност изказвам на проф. д-р Радка Власева и чл. кор. Йорданка Кузманова за подкрепата и ценните съвети при разработването на дисертационния труд.

Благодаря на семейството ми за търпението, обичта и вяра в мен.

Дисертационният труд се състои от 142 страници, 18 таблици и 40 фигури. В списъка на цитираната литература са посочени 282 литературни източници, от които 58 на кирилица и 224 на латиница.

Номерацията на разделите, таблиците и фигурите в Автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

Защитата на дисертацията ще се състои на 2023 г. от часа в Заседателната зала на Земеделски институт – Стара Загора. Материалите във връзка със защитата са на разположение при научния секретар на ЗИ – Стара Загора.

Научно жури:

Проф. д-р Живко Кръстанов

Проф. д-р Петя Славова

Проф. д-р Петър Панайотов

Проф. д-р Живка Гергурска

Доц. д-р Николина Найденова

Рецензиите и становищата на членовете на Научното жури, както и Авторефератът, са публикувани на сайта на Земеделски институт – Стара Загора:

<http://www.szinstitute.com/>

I. Увод

Животновъдството е един от най-бързо растящите селскостопански сектори, допринасящи за около 40 процента от глобалната стойност на земеделското производство, осигуряващ поминъка и продоволствената сигурност на почти 1,3 милиарда души. Нарастващото производство на животински храни поставя остро въпроса за субтерапевтичното използване на антибиотици в храната за животни и развитието на антибиотична резистентност в микробните популации, свързани с болести при хора и животни.

Глобалното разпространение на антимикробната резистентност изисква разработването на ефективни антибиотични алтернативни терапии в животновъдството, където се консумира почти две трети от глобалната доставка на антибиотици. Пробиотиците трябва да осигурят както профилактична, така и терапевтична ефикасност, за да контролират резистентните на антибиотици бактерии и да повлияят на резултатите от лечението.

За да се използват ефективно пробиотиците, е важно да се установи начина им на действие в червата, както и вторичните ефекти в животинските продукти и околната среда. Една от критичните области на изследване е влияние на пробиотичните терапии върху качеството на млечните продукти при конкретни обработващи технологии. Друга критична област е липсата на експериментални изследвания за нивата на антибиотични остатъци и резистентни бактерии в околната среда след преминаване към пробиотична терапия. Изследванията са насочени към запълване на тази празнина в данните, разработването на ефективни антибиотични алтернативни терапии, намаляване на AMR в околната среда и съхраняване здравето на потребителите и животните.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия труд е да се изследва влиянието на пробиотик „Зоовит”, приеман с дажбата, върху физикохимичните, микробиологични и технологични свойства на краве мляко.

За постигане на поставените цели си поставихме за изпълнение следните задачи:

1. Изследване влиянието на пробиотика „Зоовит” върху основни физикохимични показатели на краве мляко през два сезона – зимен и летен.
2. Изследване влиянието на пробиотика „Зоовит” върху основни микробиологични показатели на краве мляко през два сезона – зимен и летен.

3. Детекция на *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* във фекалната маса на животните.

4. Изследване влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху основни технологични показатели на краве мляко от крави с добавка на пробиотик към дажбата.

5. Изследване влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху качеството на киселото мляко по класическата технология.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Експериментални животни

Изследванията бяха проведени при спазване на българското законодателство относно хуманно отношение и защита на животните. В опитите бяха включени крави - млечно направление от животновъден обект, гр. Пловдив, рег №4000-0001. Броят на животните по време на изследванията в обекта е 198, от които 110 са дойни крави, 66 юници и 22 телета. По време на изследванията животните се хранят по рецепти в съответствие с възрастта и физиологичното състояние. За установяване влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху физикохимичните, микробиологичните и биологичните качества на млякото са сформирани две отделни групи по 30 млекодайни животни - опитна /група 1/ и контролна /група2/. Двете групи животни се хранят ежедневно с 15 kg комбиниран фураж, 20 kg силаж и 4 kg люцерново сено. Към комбинирания фураж на опитната се прибавят 0,600 kg пробиотик (0,020 kg на крава). Изследванията са извършени през два сезона – зимен – м. декември, януари и февруари и летен – м. юни, юли, септември и октомври. Изследвани са по три броя сборни паралелни проби от сутрешно сурово мляко (по 1 литър), издоено от животните, хранени с пробиотик, и три броя от животните от контролната група дневно.

За анализ са подложени шест броя фекални проби от крави, хранени с фураж, съдържащ пробиотика „ЗООВИТ“, събирани в периода май и юни 2017, както и три произволно избрани контролни проби от крави, неприемащи пробиотичния препарат.

2. Пробиотик „Зоовит“

Пробиотичен препарат "Зоовит", произведен в "ЛБ лакт БАС" ЕООД. Той съдържа четири щам млеко-кисели бактерии - *Lactobacillus delbruedki subsp. bulgaricus* (F12), *Streptococcus salivarius subsp. termophilus* (9), *Lactobacillus acidophilus* (17), *Lactobacillus lactis* (B) и един щам *Propionibacterium*.

Наличието на пет щама подобрява неговата ефективност и разширява спектъра на действие.

3. Методи за анализ

Пробите са анализирани в Изследователската лаборатория за мляко и млечни продукти “ЛБ Лакт” - Пловдив по следните показатели: физикохимични, микробиологични и технологични.

Технологичните свойства на млякото са характеризирани въз основа на 4 основни показатели: биологична активност чрез ферментационна проба (h); сирицна (ензимна) коагулация (τ/min); синерезис на коагулума (mL); киселинообразуване ($^{\circ}\text{T}$).

3.1.Физикохимични показатели

3.1.1 Активна и титруема киселинност

Активна киселинност – рН е определена потенциометрично с помощта на рН-метър MS 2011 (Microsyst, Пловдив, България), снабден с рН електрод Sensoret (Garden Grove, CA, САЩ). Общата титруема киселинност по БДС 1111-1980.

- Млечна мазнина - чрез метода на Гербер (ISO 2446:2008 (IDF 226:2008)).

- Сухо вещество - чрез изсушаване на пробата при температура $100\pm 105^{\circ}\text{C}$ в продължение на 4 h /БДС 1109:1989/.

- Общ белтък съгласно БДС EN ISO 8968-1:2014.

3.2 Микробиологични показатели

3.2.1.Определяне броя жизнеспособни клетки на млечнокиселите бактерии (cfu.cm⁻³) по ISO 7889:2005

Претеглят се 10 g от изследваната проба и се прехвърлят в стерилна колба от 200 cm³. Към пробата се добавя 90 cm³ стерилен разреждател. От това първоначално разреждане се правят десетократни падащи разреждания, като със стерилна пипета се внасят 1 cm³ от предходното разреждане в следващата епруветка. Броят на десетократните разреждания се определят в зависимост от очакваният титър активни клетки. След това от последните разреждания се правят посявки с по 1 cm³ в стерилно петри.

След изтичане на времето за инкубация, петритата се изваждат от термостата и се изброяват прорасналите колонии и се изчислява количеството на активни клетки по следната формула:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

където: N е числената стойност на броя на характерните микроорганизми в 1 g от пробата, cfu.cm⁻³; V-обем на посева, cm³; ΣC е числената стойност на сумата от колонииите на всички изброени петриевеи блюда; n₁ - брой на петриевите блюда от първото разреждане; n₂ - брой на петриевите блюда от второто разреждане; 0,1 коефициент; d е фактор на разреждането съответстващ на първото от изброяваните разреждания.

Когато резултатите се отчитат от три последователни разреждания, концентрацията на активни клетки се изчислява по следната зависимост:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2 + 0,01 \cdot n_3) \cdot d}$$

където n₃ е броя на петриевите блюда от третото разреждане.

3.2.2. Морфологични характеристики на млечнокиселите бактерии

Морфологичните характеристики на шамовете млечнокисели бактерии са определени чрез оцветени микроскопски препарати, микроскопирани с микроскоп Olympus BX41.

3.2.3. Определяне на общ брой микроорганизми съгласно БДС EN ISO 4833-1:2013

Общият брой микроорганизми е определен по метода на десетократните разреждания. Суровото мляко се хомогенизира, от него се отмерва 1 cm³ и се прехвърля в епруветка, съдържаща 9 cm³ физиологичен разтвор, следва хомогенизиране и от тази епруветка се взема 1 cm³ и се прехвърля в следваща. Това се повтаря до достигане на необходимата степен на разреждане. От последните три разреждания се правят посявки с 1 cm³ посевен материал. Посетите петриевеи блюда се заливат с 15 cm³ разтопена и охладена до 44÷47 °C хранителна среда SMA. Изчаква се средата да се втвърди и петриевите блюда се поставят в термостат, където се термостатират при 30 °C за 72±3 часа. След изтичане на времето петриевите блюда се изваждат от термостата, изброяват се прорасналите колонии в две последователни разреждания и се изчислява общото микробно число по формулата:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

3.2.4. Определяне на общ брой соматични клетки съгласно БДС EN ISO 13366-1:2008

Пробата сурово мляко, предназначена за определяне на соматични клетки, се охлажда непосредствено след нейното вземане до температура 2 ± 6 °C. Изследването на пробата се извършва не по-късно от 6 часа след приемането ѝ в лабораторията.

Броят на соматичните клетки в 1 cm^3 се изчислява като се умножи броя на изброените ивици по работният фактор на микроскопа.

3.2.5. Определяне на *Escherichia coli* съгласно ISO 16649-2:2014

За целта се претеглят 10 g от изследваната фекална маса в пробата и се поставят в 90 cm^3 стерилен разреждател. От това първоначално разреждане се правят няколко последователни десетократни разреждания в зависимост от очакваната обсемененост на пробата. Изброяват се типичните колонии, които са оцветени в синьозелен цвят, в две последователни разреждания и се изчислява количеството на активни клетки от *Escherichia coli* по следната зависимост:

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

3.2.6. Определяне на *Staphylococcus aureus* съгласно БДС EN ISO 6888-1:1999/A2:2018

Броят (N) на коагулазоположителните стафилококи в 1g от изследвания продукт се изчислява по следната формула:

$$N = \frac{\sum a}{v \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

където a - сума от колониите на коагулазоположителни стафилококи, съдържащи се в петриевите блюда от две последователни разреждания;

където: v – обем на посевния материал; n_1 – брой на петритата от първото от изброяваните разреждания; n_2 – брой на петритата от второто от изброяваните разреждания;

d – фактор на разреждането, съответстващ на първото от изброяваните разреждания.

3.2.7. *Listeria monocytogenes* съгласно БДС EN ISO 11290-1:2017

3.2.8. Колиформи съгласно ISO 4832:2006

3.2.9. *Enterobacteriaceae* съгласно ISO 21528-1,2:2017

3.2.10. Плесени и дрожди, съгласно БДС ISO 6611:2004.

3.2.11. *Salmonella spp.* ISO 6579-1:2017

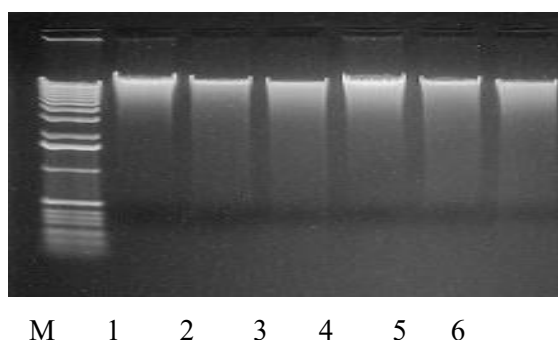
4. Определяне на сулфитредуциращи колонии във фекална маса съгласно ISO 15213:2003

5. Използване на PCR анализ за детекция на *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* във фецес на крава

На анализ са подложени шест броя фекални проби от крави, хранени с фураж, съдържащ пробиотика „ЗООВИТ“, събирани в периода май и юни 2017г., както и три произволно избрани контролни проби от крави, неприемащи пробиотичния препарат. Един грам фекална маса се суспендира и хомогенизира много добре в 9 cm³ стерилна пептонна вода, след което се правят десетократни падащи разреждания. От всяко разреждане се прави посев върху MRS агар. Посетите петрита се инкубират при 37±1°C за 48 часа.

За екстракция на ДНК от колонии от различните проби от кравешки фецес се използва кит за изолиране Gene Jet™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, USA). Първоначално се приготвя лизис буфер (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA, 1.2 % Triton X-100), който съдържа лизозим 20 mg.ml⁻¹. Пробите се инкубират за 30 min на 37 °C. По-нататъшното изолиране на ДНК от фекални проби с помощта на този кит е извършено съгласно инструкциите на фирмата производител.

Честотата на ДНК в екстрактите е определена 0,7 % агарозна гел електрофореза (Фигура 1).



Фигура 1. Определяне на чистотата на изолираната ДНК от шесте проби от кравешки фецес

М - 100 bp молекулярен маркер (Bioneer, Korea);

1-3 изолирана ДНК от фекална маса на контролни крави, отглеждани без прием на пробиотици;

4-6 изолираната ДНК от фекална маса на три крави, които са приемали пробиотици.

Видово-специфичен PCR анализ за наличие на *L. delbrueckii* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* във фекални проби.

За определяне наличието на *L. delbrueckii* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* в кравешки фецес се приложи PCR анализ с видово-специфични праймери (Lick *et al.*, 2000; Lick *et al.*, 2001). Общата PCR реакция в обем от 25 µl от Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads кит (GE Healthcare UK Limited, Великобритания), съдържа: BSA, 200 µM концентрацията на всеки от нуклеотидите dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 единици от PuReTaq ДНК полимераза и реакционен буфер (10 mM Tris-HCl, (pH 9,0 при стайна температура), 50 mM KCl и 1.5 mM MgCl₂). Към реакционната смес се прибави приблизително 20÷30 ng от пречистената ДНК и по 1 µM от всеки праймер. Отрицателната PCR контрола съдържа само стерилна дейониизирана вода вместо ДНК. Нуклеотидната последователност на използваните праймери е представена в таблица 1. Условието на PCR реакцията за амплифициране на PCR продуктите са обобщени в таблица 2. PCR продуктите с големина приблизително 678 и 715 kb са разделяни на 1,2 % агарозен гел.

Десет произволно подбрани колонии от три крави от контролната и три от опитната група се използват за PCR анализ с цел да се определи наличието на живи *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* във фекални проби. Изследването се извърши с използването на ДНК, изолирана от единична колония от дадена млечнокисела бактерия, развила се върху агарова MRS среда. За целта колонията се разтвори в 50 µl TE буфер (10mM Tris-HCl и 1mM EDTA, pH=8), към който предварително е прибавен лизозим 20 mg.ml⁻¹.

Таблица 1. Нуклеотидна последователност на видово специфични праймери, Fw-прав праймер, Rv-обратен праймер

Вид	Нуклеотидна последователност	Големина (базови единици)	Литература
<i>L. delbrueckii</i>	Fw-AAT TCC GTC AAC TCC TCA TC	715	Lick <i>et al.</i> , 2000
	Rv-TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA		
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Fw-CCT CAT CAA CCG GGG CT	678	Lick <i>et al.</i> , 2000; Lick <i>et al.</i> , 2001
	Rv-TGA TCC GCT GCT TCA TTT CA		

Пробите се инкубират при 37 °C за 30 min. ДНК се приципитира с прибавянето на 3 пъти обема пробата 100 % етанол и 1/10 от обема 3М натриев ацетат. След центрофугиране на 10000 x g, утайката се промива два пъти с 70 % етанол и се разтваря в 20 µl TE буфер. Един µl от всяка проба се използва като матрица в PCR реакция при същите условия, описани по-горе.

Таблица 2. Условията на PCR реакцията за амплифициране на видово-специфичните PCR продукти

Температурен режим	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
Първоначална денатурация	95°C-10 мин	95°C-10 мин
	10 цикъла	
Денатурация	95°C-20 сек	95°C-20 сек
Хибридизация	55°C-20 сек	65°C-20 сек
Удължаване	72°C-40 сек	72°C-40 сек
	35 цикъла	
Денатурация	95°C-20 сек	95°C-20 сек
Хибридизация	50°C-30сек	60°C-30 сек
Удължаване	72°C-1 мин	72°C-1 мин
Крайно удължаване	72°C-10 мин	72°C-10мин

6. Органолептични показатели

Органолептичната оценка на пробите кисели млека се извършва съгласно десетстепенна хедонистична скала. Основните органолептични показатели, по които се формира органолептичната оценка, са: външен вид, цвят, вид на коагулума, консистенция, вкус и аромат.

7. Математико-статистически анализ на получените данни

Направен е статистически анализ на средните стойности от трикратните повторения. Проведен е анализ на променливите (oneway ANOVA) с ниво на значимост $P \leq 0,05$ (Drazer and Smith, 1998). Проведен е тест на Turkey за множествени сравнения с ниво на значимост $P \leq 0,05$. Разлика между стойностите по-ниски от 0,05 се считат за статистически значими (Kenward, 1987). Всички статистически процедури са проведени с помощта на софтуер Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot 11.0.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

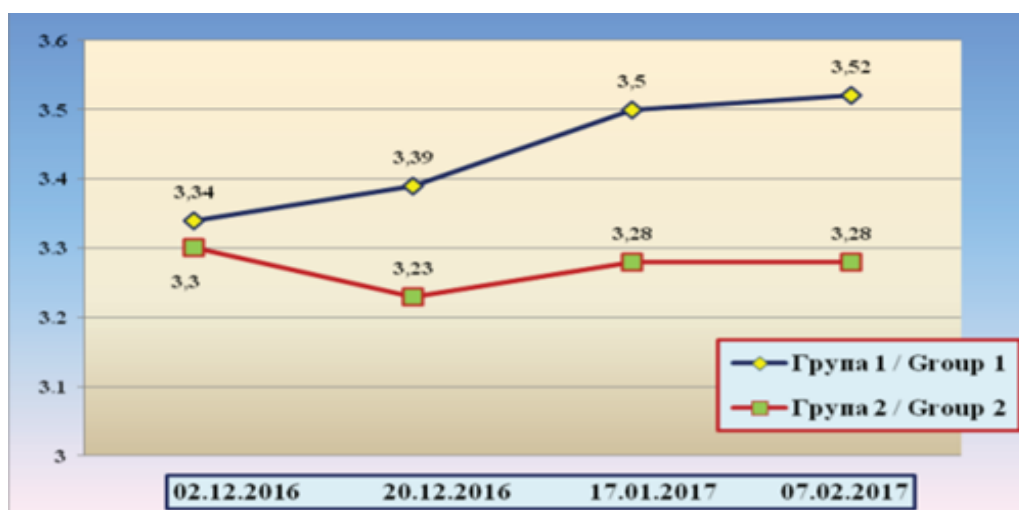
1. Изследване влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху физикохимичните, микробиологични и технологични свойства на млякото

1.1. Изследвания за влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху основни физикохимични показатели на млякото

Физикохимичните показатели на суровото мляко лимитират неговите технологични свойства и качество. Те са зависими от типа и количество на дажбата, стадий на лактация, здравословно състояние. Резултатите от проведените изследвания на физикохимичните показатели на млякото, получено от крави, приемали пробиотик с хранителните дажби през зимен и летен сезон, са представени на фигури и таблици.

1.1.1. Изследване на белтъчното съдържание на млякото – зимен и летен сезон

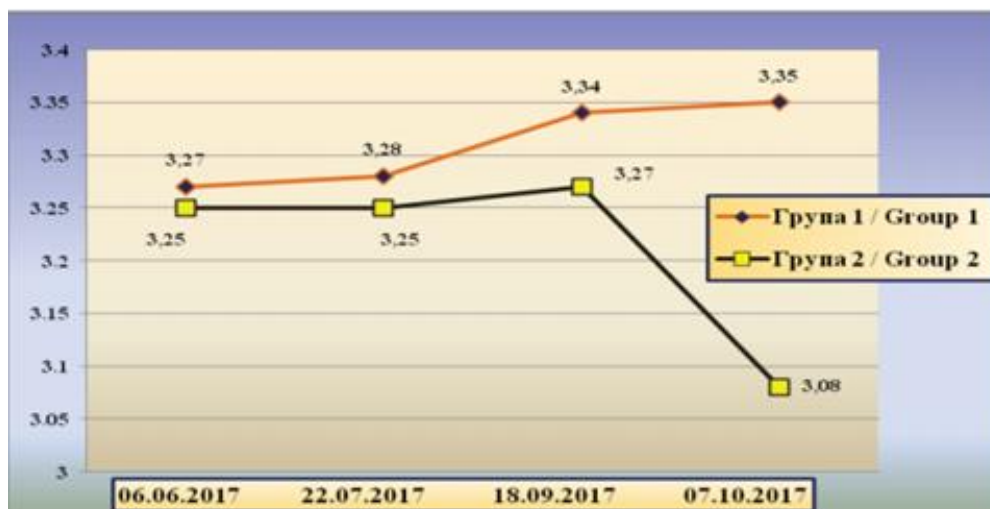
На фигура 2 са представени резултатите за белтъчното съдържание на млякото през зимния период. От тях се вижда, че по-високи са стойностите на белтъка в млякото на кравите, приемали пробиотик през периода от 02.12. до 07.02., и е в граници от 3,34 до 3,52 %. С продължаване приема на пробиотик нараства и влиянието на пробиотика върху количеството на белтъчните вещества, като най- значително е 18 дни след приемането му от животните.



Фигура 2. Белтъчно съдържание на млякото - зимен сезон

На фигура 3 са представени резултатите относно влиянието на пробиотика върху белтъчното съдържание на млякото през летния период (м. юни - м. октомври). От тях се вижда, че влиянието на пробиотика през изследвания период е по-слабо изразено от това през зимния период - от 3,27 до 3,35 %. За

разлика от зимния период влиянието на пробиотика върху белтъчното съдържание на млякото е подчертано по-активно след 46 дни от приема на пробиотика.

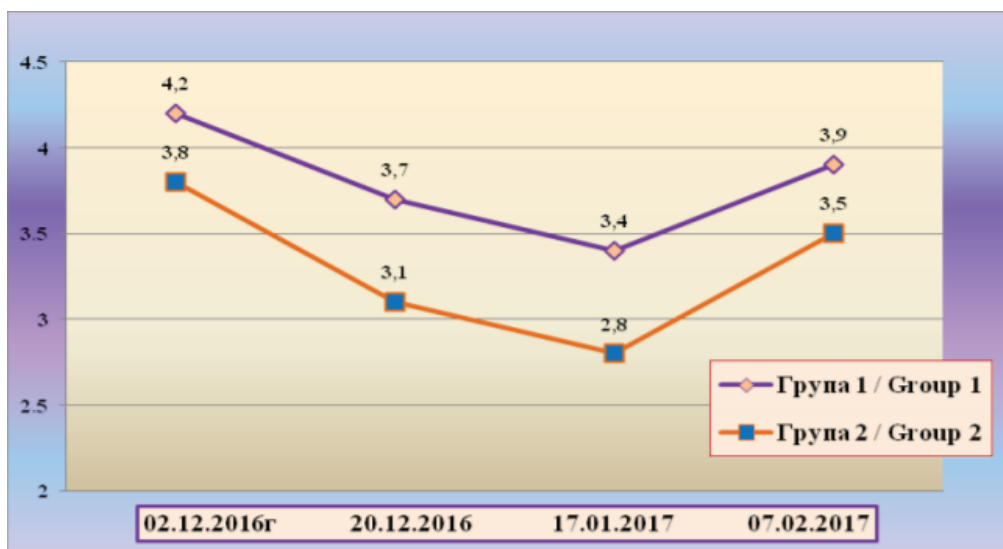


Фигура 3. Белтъчно съдържание на млякото- летен сезон

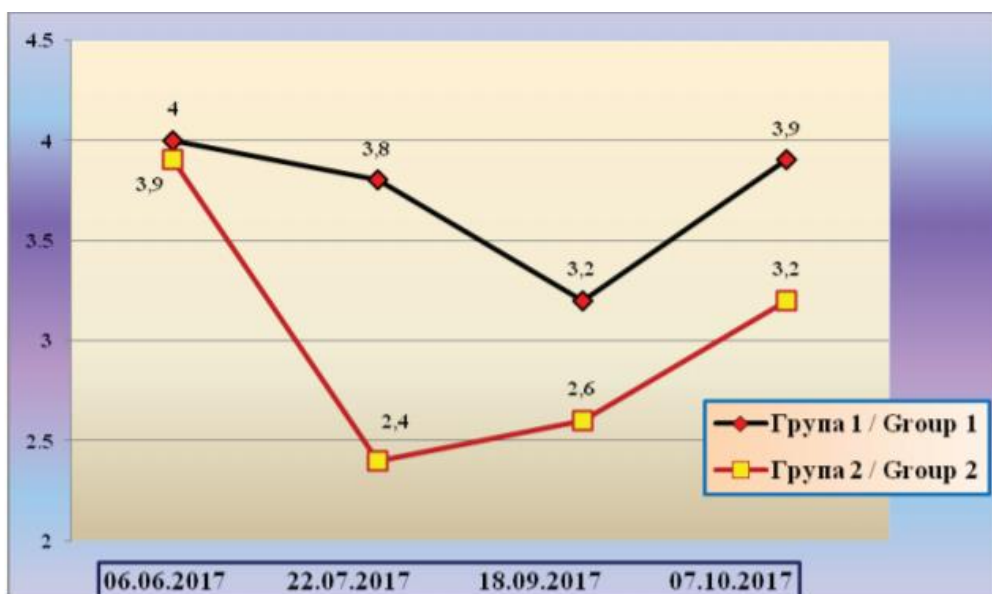
1.1.2. Изследване на масленото съдържание на млякото – зимен и летен сезон

На фигура 4 и фигура 5 са представени резултатите от проведените изследвания относно влиянието на пробиотика върху количеството на масните вещества в млякото през летния и зимния сезон. Данните потвърждават становището на други автори, че маслената материя на млякото зависи най-вече от хранителния режим и по-малко от пробиотика.

Процентът масни вещества в млякото на кравите, получавали пробиотик, е незначително по-висок през двата сезона в сравнение с тези от контролната група. През летния период варирането на този показател е по-голямо, с два пика при опитната група животни, което според нас се дължи на високите температури, тъй като храненето е еднотипно през цялата година.



Фигура 4. Маслено съдържание на млякото- зимен сезон

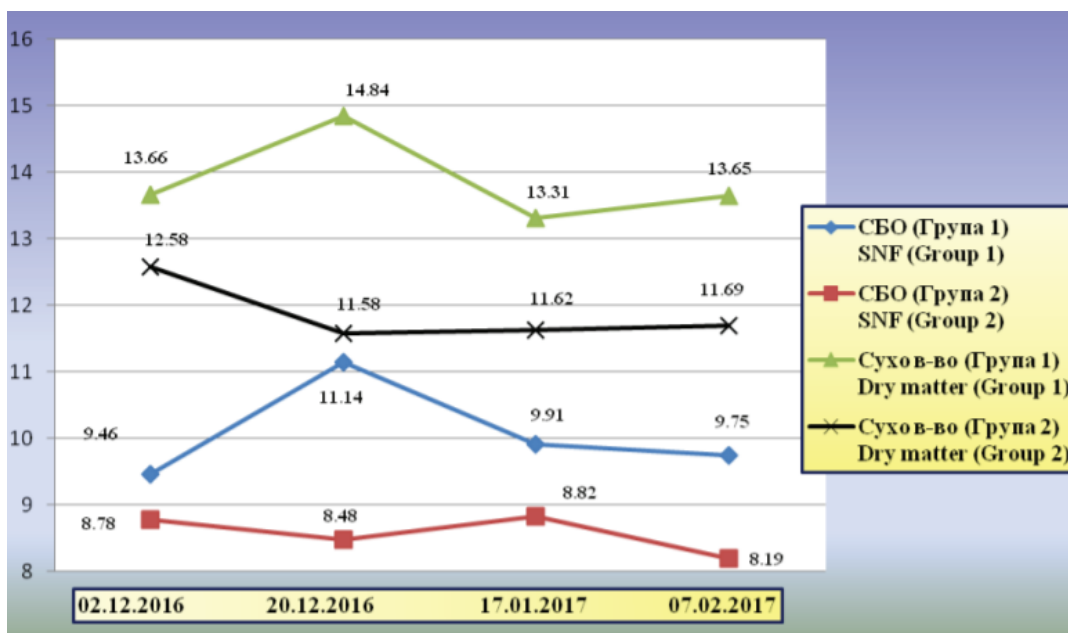


Фигура 5. Маслено съдържание на млякото - летен сезон

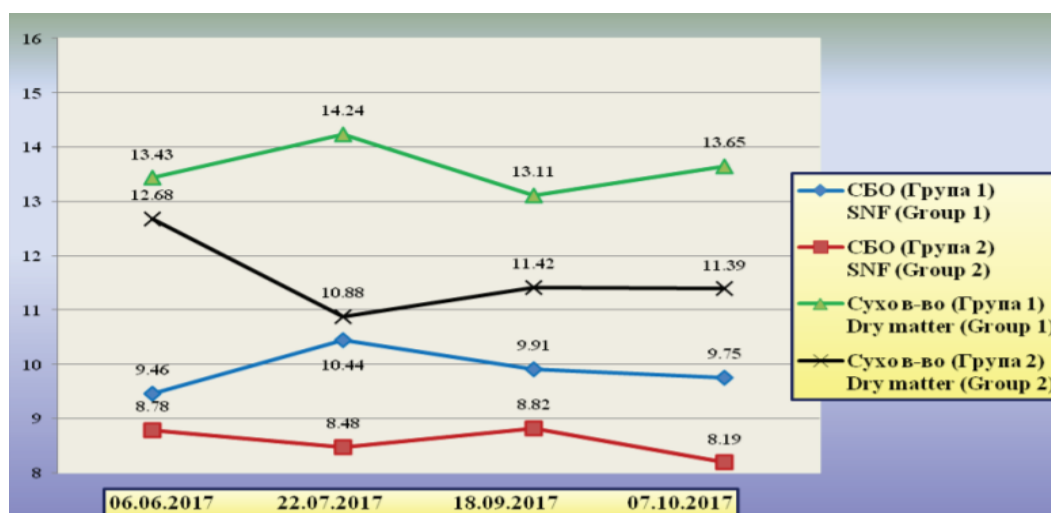
1.1.3. Изследване на сухото вещество и СБО на млякото – зимен и летен сезон

Сравнителните изследвания на млякото на крави от опитната и контрона група (фиг. 6 и фиг.7) показват, че през зимния период разликата в сухото вещество между тях за периода 02.12. - 07.02. достига 1,96 %, а разликата в сухото вещество през летния период 06.06. - 07.10. (фигура 9) е съответно 1,26 %.

Това вероятно се дължи на влиянието на пробиотика върху съдържанието на белтъчни вещества и по-малко на маслеността.



Фигура 6. Сухо вещество и СБО на млякото - зимен сезон



Фигура 7. Сухо вещество и СБО на млякото- летен сезон

Получените данни за СБО следват тенденцията за съдържание на сухо вещество. През двата сезона на опита млякото на животни, получавали в дажбите си пробиотик “Зоовит”, са с по-високо съдържание на СБО в сравнение с тези от контролната група. Наблюдават се два пика – през м. август и м. декември при опитната група, докато при контролната имаме спад в съдържанието на СБО в края на двата опитни периода.

1.2. Изследвания за влиянието на пробиотика „Зоовит” върху основни микробиологични показатели на млякото

1.2.1. Микробиологични изследвания – летен сезон.

1.2.1.1. Количество на общ брой микроорганизми в млякото

На фигура 8 са отразени данните за общ брой микроорганизми в млякото през летния сезон при двете групи животни – опитна и контролна. Количеството на общия брой микроорганизми през летния сезон в млякото на крави, получавали с дажбата пробиотик, е от $8,7 \cdot 10^5$ до $1,3 \cdot 10^5$ cfu.mL⁻¹. В млякото на животните от контролната група животни количеството на общия брой микроорганизми е в граници от $2,7 \cdot 10^6$ до $2,5 \cdot 10^6$ cfu.mL⁻¹. Данните показват тенденция за влияние на добавката на пробиотик „Зоовит“ върху общия брой микроорганизми на млякото през посочените месеци.



Фигура 8. Количество на общ брой микроорганизми в млякото – летен сезон

1.2.1.2. Количество на общ брой соматични клетки в млякото

Показателно е влиянието на пробиотика върху общия брой соматични клетки (фигура 9). Тяхното количество в изследвания период в млякото се движи от 108 000 до 138 000 cells.mL⁻¹, спрямо 200 000 до 202 000 cells.mL⁻¹ на контролата за същия период. Ефектът на пробиотика при изпитването за намаляване на соматичните клетки в млякото е 46 %.



Фигура 9. Количество на общ брой соматични клетки в млякото – летен сезон

В изследваното от нас мляко при опитната и контролна групи не е установено наличие на салмонела и листерия моноцитогенес.

1.2.1.3. Количество на плесени в млякото

Общото количество на плесени в млякото на крави, получавали с дажбата пробиотик е средно от 36 до 77 cfu.mL⁻¹, а в млякото на контролата от 290 до 700 cfu.mL⁻¹. Данните показват, че в резултат на влиянието на пробиотика количеството на плесените в млякото е 6,2 пъти по-малко в сравнение с контролата (фигура 10).



Фигура 10. Количество на плесени в млякото – летен сезон

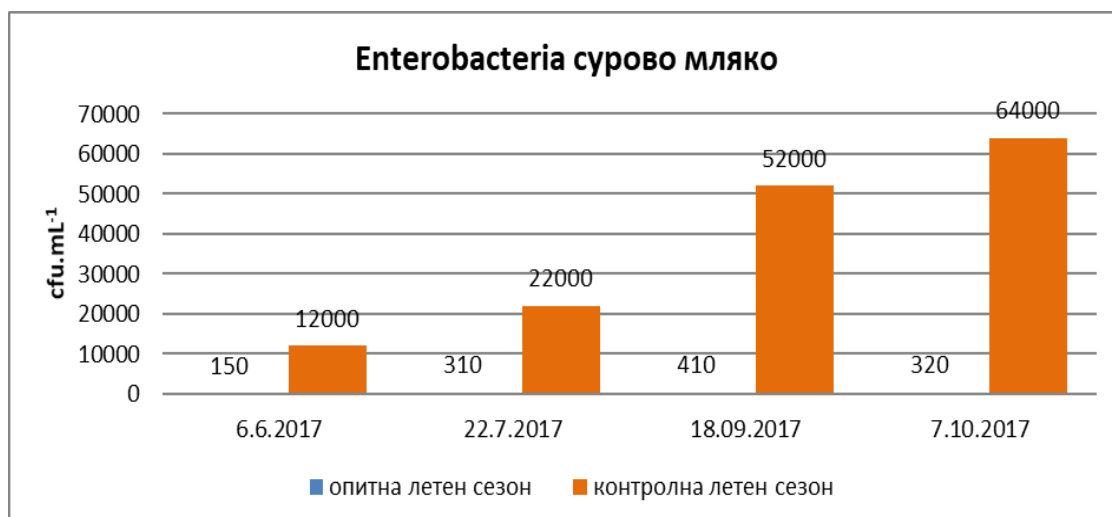
1.2.1.4. Количество на дрожди в млякото

Положително е влиянието на пробиотика относно съдържанието на дрожди и ентеробактерии в млякото, показано на фигура 11. В периода на изследване количеството на дрождите в млякото от крави, приемали пробиотик, е средно 178 cfu.mL^{-1} , а количеството на дрождите в контролата е средно 7655 cfu.mL^{-1} . Данните показват, че млякото с пробиотик има 43 пъти по-малко дрожди в сравнение с контролата за целия период на изследване.



Фигура 11. Количество на дрожди в млякото – летен сезон

Пробиотичните добавки са използвани за намаляване на чревното пренасяне на антимикробно резистентни Ентеробактерии. Млякото от експерименталните проби с дажди на пробиотик във фуражите има средно 1940 cfu.mL^{-1} , а контролата – $37\,500 \text{ cfu.mL}^{-1}$, или 19 пъти повече ентеробактерии в млякото (фигура 12), като разликите са достоверни. От таблица 5 е видно, че тези разлики са по-значителни при пробите през м.септември и м.октомври. През същите месеци се установява и завишаване на ентеробактериите в млякото на крави от контролната група.



Фигура 12. Количество на ентеробактерии в млякото – летен сезон

1.2.2. Микробиологични показатели – зимен сезон

1.2.2.1. Количество на общ брой микроорганизми в млякото - зимен сезон

При анализите на мляко през зимния период се наблюдава аналогична на летния период тенденция. Общият брой микроорганизми през зимния сезон в периода на изследване в мляко с пробиотик се движи от $3,7 \cdot 10^5$ до $3,3 \cdot 10^5$ cfu.mL⁻¹, а на контролата за същия период е в границите от $4,9 \cdot 10^6$ до $2,2 \cdot 10^6$ cfu.mL⁻¹. От данните е видно, че използваният от нас пробиотик „Зоовит“ влияе за понижаване на общия брой микроорганизми в млякото 8,8 пъти (фигура 13).



Фигура 13. Количество на общ брой микроорганизми в млякото – зимен сезон

1.2.2.2. Количество на общ брой соматични клетки в млякото - зимен сезон

При анализ на съдържанието на общия брой соматични клетки в млякото на крави, приемали с дажбите пробиотик, се установява същата тенденция, както през летния период. Данните показват 7,7 пъти по-малък брой соматични клетки в млякото на животни, приемали пробиотик, в сравнение с контролата (фигура 14б) при висока степен на достоверност.



Фигура 14. Количество на общ брой соматични клетки в млякото – зимен сезон

През зимния сезон не се установява наличие на салмонела и листерия моноцитогенес в млякото на животните от двете групи.

1.2.2.3. Количество на плесени в млякото - зимен сезон

Общото количество на плесени във вариантите с пробиотик е средно от 15 до 38 cfu.mL⁻¹, а в млякото на контролата от 180 до 670 cfu.mL⁻¹ (фигура 15). Това показва, че в резултат на влиянието на пробиотика, количеството на плесените в млякото е 12 пъти по-малко в сравнение с контролата. Освен като подобряващ здравословния статус на животните, пробиотик „Зоовит“ спомага и за получаване на качествено и безопасно мляко.



Фигура 15. Количество на плесени в млякото – зимен сезон

1.2.2.4. Количество на дрожди в млякото - зимен сезон

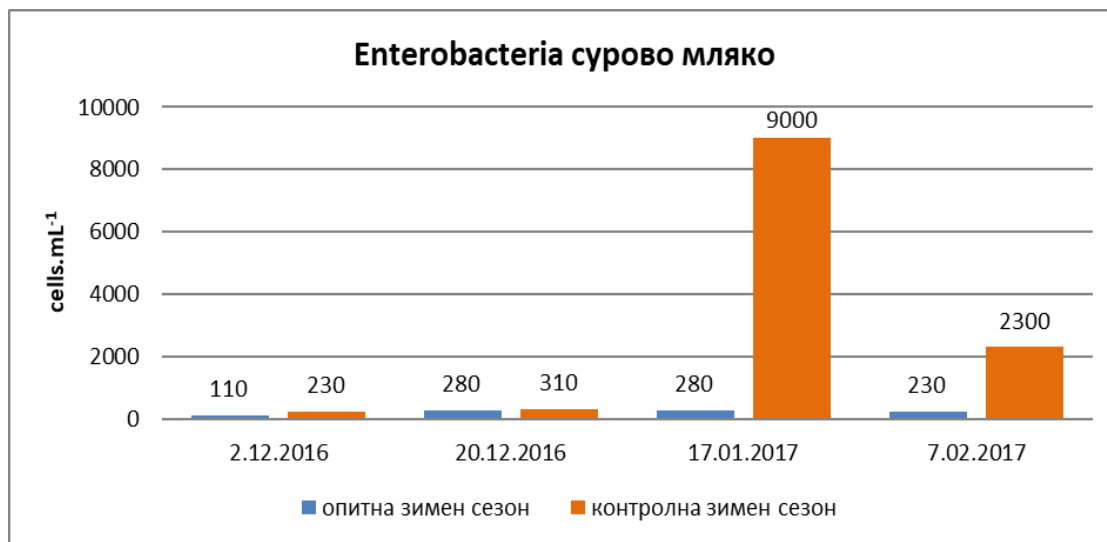
При анализ на дрождите също се установи положително влияние на пробиотици. На фигура 16 са посочени данните за съдържанието на дрожди в млякото на крави от опитната и контролна група. В периода на изследване количеството на дрождите в млякото от крави, приемали пробиотик, е средно 867,5 cfu.mL⁻¹, а количеството на дрождите в контролата е средно 23660 cfu/ml. Както при плесените, млякото на кравите от опитната група съдържа значително по-малко дрожди (27 пъти) в сравнение с контролата за същия период.



Фигура 16. Количество на дрожди в млякото – зимен сезон

1.2.2.5. Количество на ентеробактерии в млякото - зимен сезон

На фигура 17 са посочени данните за количеството на ентеробактериите в млякото през зимния сезон. Както и през летния, е установено значително влияние на пробиотика. Млякото от експерименталните проби с дажби на пробиотик във фуражите има средно $197,5 \text{ cfu.mL}^{-1}$ ентеробактерии, а контролата – 2960 cfu.mL^{-1} или 15 пъти повече ентеробактерии в млякото. Това е важно за получаване на качествена суровина и млечни продукти.



Фигура 17. Количество на ентеробактерии в млякото – зимен сезон

Влиянието на пробиотик „Зоовит“ върху съдържанието на дрожди и ентеробактерии е по-силно през зимния период в сравнение с летния.

Ефектът на въздействие на пробиотика върху дрождите, който е около 2,5 пъти по-висок през зимния сезон, се обяснява с по-богатите възможности с обсеменяване с дрожди на зимните фуражни храни на животните. Очевидно е, че при оборното отглеждане на животните през зимния сезон и храненето с ферментирани фуражни храни се увеличава значително съдържанието на ентеробактерии. Това обяснява и голямата разлика на ефекта на въздействие на пробиотика върху тази група микроорганизми, който през зимния сезон е 11,65 пъти по-висок.

Получените резултати относно влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху микробиологичните показатели на млякото ни дават основание да считаме, че пробиотикът, приеман с дажбите на животните, оказва въздействие върху следните микробиологични показатели на млякото: общ брой микроорганизми, общ брой соматични клетки, плесени, дрожди, ентеробактерии.

1.3.2. Влияние на пробиотика върху *Escherichia coli*, Колиформи, *Staphylococcus aureus* и *Clostridium sp.* във фекалната маса на животните

Резултатите от тези изследвания са представени в таблица 3. От представените данни е видно, че във фекалната маса не се установяват *Staphylococcus aureus* и *Clostridium sp.*, както за контролната група животни, така и за животните, приемащи пробиотичната добавка.

Таблица 3. Влияние на пробиотика върху съдържанието на микроорганизми

Микроорганизъм	Контрола	С пробиотик
<i>Escherichia coli</i>	1,5.10 ⁵ cfu/g	5,5.10 ³ cfu/g
Колиформи	3,5.10 ⁵ cfu/g	2,1.10 ⁴ cfu/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Отсъствие	Отсъствие
<i>Clostridium sp.</i>	Отсъствие	Отсъствие

При *Escherichia coli* и Колиформите се установи значително понижаване на тези микроорганизми във фекалните маси на животните, хранени с фураж, съдържащ пробиотика. Като при *Escherichia coli* се наблюдава редукция на активните клетки с две логаритмични единици при животните, приемащи пробиотика, в сравнение с контролната група. За колиформите редукцията при кравите, приемащи пробиотик, е с една логаритмична единица в сравнение с контролата. Изразено като процент на ефективност на пробиотика относно намаляването на изследваните микроорганизми, във фекалната маса се наблюдава 3,67 % намаляване на съдържането на *Escherichia coli* във фекалната маса на животните и с 6,0 % намаляване на съдържанието на колиформите.

1.3.3. Детекция на *L. delbrueckii* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* чрез PCR чрез използването на тотална ДНК от фекални проби на крава.

Микробиологична характеристика

Много малко проучвания има върху влиянието на пробиотиците върху микробиома на фекалната маса. Намаляване количеството патогенни бактерии във фекалните маси е показател за здравословния статус на животните и за броя патогенна микрофлора в търбуха. Този показател е от значение и за опазване на околната среда и здравето на работещите във фермите.

Съдържанието на МКБ в кравешки фекалии, изолирани на среда MRS, при контролата варира между 7.17÷7.32 log cfu.g⁻¹, докато при пробите с пробиотици варира между 7.36÷7.54 log cfu.g⁻¹. Завишен е броят МКБ във фекалиите на кравите, приемали пробиотици, в сравнение с контролните крави.

Наличие на ДНК от *L. delbrueckii* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* чрез PCR чрез използването на тотална ДНК от фекални проби на крава.

При провеждане на PCR реакциите се установи наличие на специфични фрагменти с големина 715 bp и 678 bp, характерни за *L. delbrueckii* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Фигура 1А и 1В) от фекалната маса на кравите, приемащи пробиотика „Зоовит“. В ДНК на контролната група животни се установиха фрагменти с големина около 150 bp, характерни за други видове млечнокисели бактерии. Това показва, че с приемането на пробиотика в стомашно-чревния канал на животните нараства значително относителният дял на *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

PCR анализ с единична колония от млечнокисела бактерия, развила се върху селективна хранителна среда.

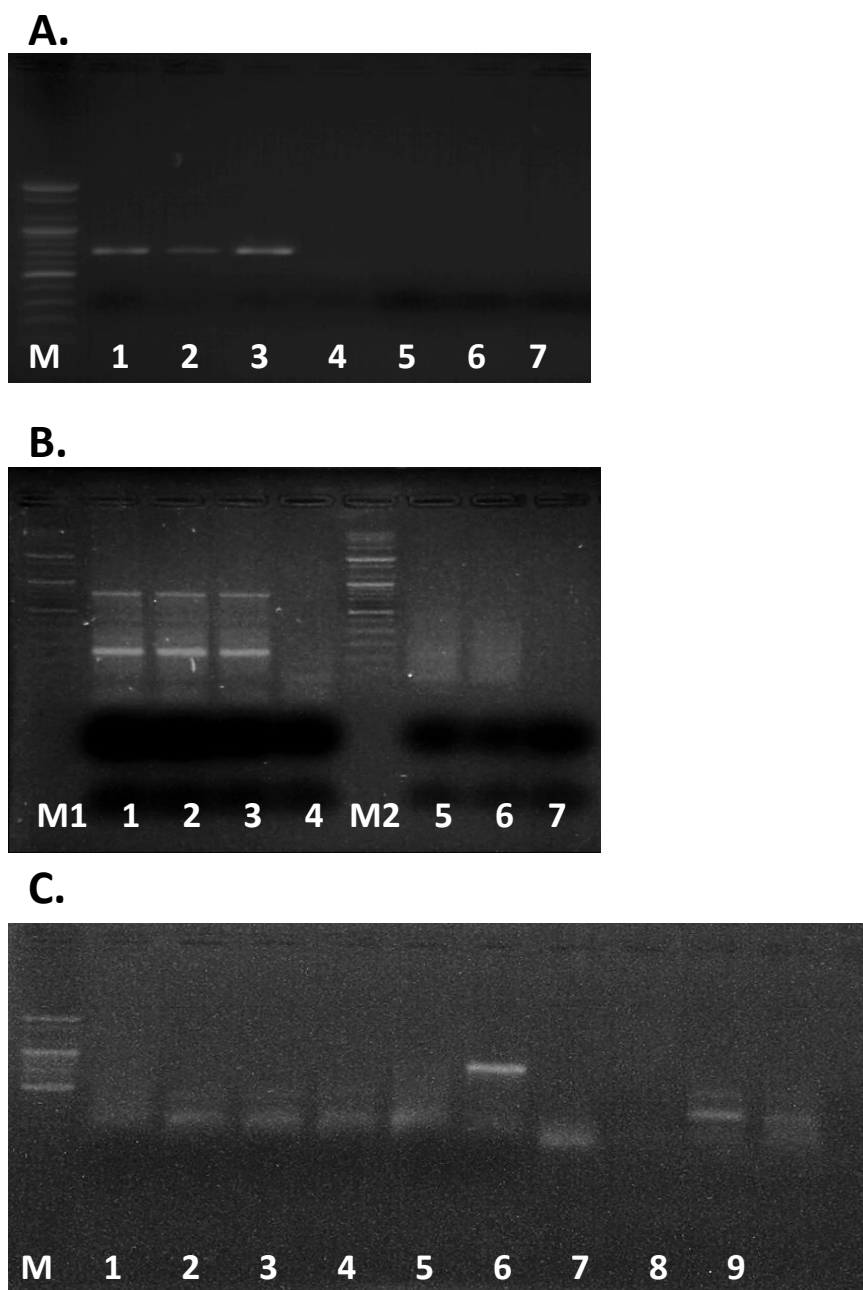
При животните, приемащи пробиотика, се установи наличие на колония номер 6 с колониална характеристика, типична за *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*. При молекулярно-генетичния анализ на тази колония се установи фрагмент с желана големина от 678 нуклеотида, когато анализът се извърши с видово-специфични праймери за *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (фигура 18).

При контролната група животни не се установиха колонии с типичната колониална характеристика за *Lactobacillus bulgaricus*. При тези животни Колонии 9 и 10 дадоха по-малки фрагменти при специфично размножаване, което най-вероятно е причинено от други видове млечнокисели бактерии, съдържащи се във фекалната маса. Този резултат съвпада с получените данни за наличие на *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* във фекалната маса на животните, приемали пробиотици (фигура 2, В). Когато колонии от контролните проби се използват за анализ, не се амплифицира по-малкия фрагмент от 150 нд, което доказва специфичността на проведения анализ.

Установено е, че общото количество на млечнокиселите бактерии се увеличава с 7.36-7.54 log cfu/g при животните, приемащи пробиотичния препарат „Зоовит“, в сравнение с контролната група животни, при които общата концентрация на млечнокисели бактерии е 7.17-7.32 log cfu.g-1.

При провеждане на молекулярно-генетична идентификация посредством PCR метода чрез използване на тотална ДНК от фекална маса на крави се установи наличие на *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, а при контролната група се откриха фрагменти с големина около 150 bp., характерни за други видове млечнокисели бактерии, което показва отсъствие на *L. Delbrueckii* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Фигура 18. Детекция на *L. delbrueckii* и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* чрез PCR чрез използването на тотална ДНК от фекални проби на крава.



При крави, приемащи пробиотичната добвка „Зоовит“, се установи наличие на колонии с колониална характеристика, типична за *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. При молекулярно-генетичния анализ на тази колония чрез PCR метода се установи фрагмент с желаната големина от 678 нуклеотида, когато анализът се извърши с видово-специфични праймери за *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. При контролната група животни не се установиха колонии с типичната колониална характеристика за *Lactobacillus bulgaricus*.

При изследване на фекалната маса за наличие на *Staphylococcus aureus* *Clostridium sp.* се установи отсъствие на посочените микроорганизми, както за контролната група животни, така и при животните, приемащи пробиотик.

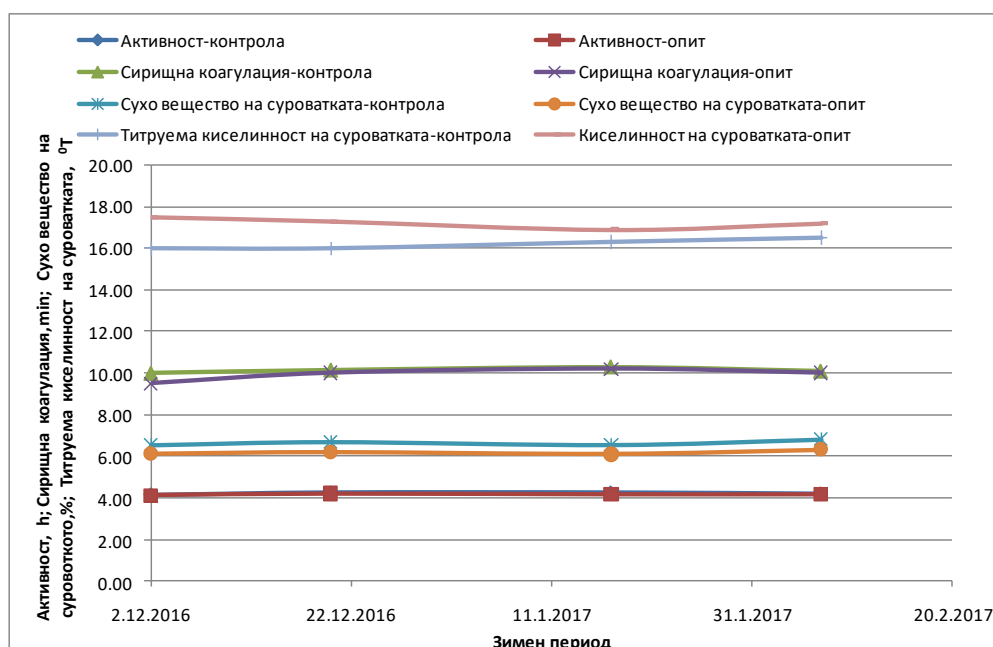
При кравите, приемащи пробиотик, се установи намаляване на концентрацията на активни клетки на *Escherichia coli* с две логаритмични единици, а за колиформите с една логаритмична единица във фекалната маса в сравнение с контролната група животни. Изразено като процент на ефективност на пробиотика относно намаляването на изследваните микроорганизми във фекалната маса, се наблюдава 3,67 % намаляване на съдържанието на *Escherichia coli* във фекалната маса на животните и с 6,0 % намаляване на съдържанието на колиформите.

1.4. Основни технологични показатели на млякото от крави с добавка на пробиотик „Зоовит” към хранителните дажби.

1.4.1. През зимния сезон

1.4.1.1. Биологична активност (ферментационна способност) на млякото - зимен сезон

През първите дни на м. декември във времето за активност на пробите от опитната и контролната група не се установява разлика /фигура 19/.



Фигура 19. Технологични свойства на млякото – зимен сезон

Времето за коагулация на млякото е 4 часа и за двете проби. В следващия период при експерименталното мляко активността е повишена, като времето за коагулация е понижено на 3,00 h, а за контролата - 3,30 h. През м. януари активността чувствително се ускорява и времето на опитната партида за ферментационния процес е 2,45 h, а за контролата - 3,15 h.

От получените резултати може да се счита определено, че влиянието на пробиотика върху изследвания период – м. декември – м. февруари става по-активно с увеличаване времето на неговия прием. Това на свой ред се потвърждава от съответствието на влиянието на пробиотика върху общия брой на микрофлората в пробите мляко.

1.4.1.2. Синерезисни свойства на коагулума - зимен сезон

Резултатите, представени на таблица 4, показват, че коагулумът на млякото от крави, приемали пробиотик „Зоовит”, има по-ускорен синерезис в сравнение с контролната група, в резултат на което времето на отделяне на необходимото количество вода за единица време е по-кратко, а това има значение за условията, при които се подлага сиренината от коагулума на пресуване за съответния вид сирене.

Добавянето на пробиотик към хранителните дажби на кравите оказва влияние и върху синерезиса на сирищния коагулум при неговата обработка. Резултатите показват, че контролата има по-бавен синерезис в сравнение с опитната. Ускоряването на синерезиса при млякото с пробиотик е 7,8 % спрямо контролата / $p < 0.001$ /.

Таблица 4. Основни биологични и технологични свойства на мляко , получено от крави, хранени с дажди, съдържащи пробиотик - зимен сезон (м. декември, януари, февруари)*

Опит №	Дата	Колич. мляко,L Проба / Контрoла	Активност, (ферментационна проба) h						Сирицна (ензимна) коагулация,min					
			Опит			Контрoла			Опит			Контрoла		
			X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%
1	02.12.16	3/3	4,10*	0,100	2,44	4,15*	0,100	2,41	9,5*	0,100	1,05	10,0*	0,100	1
2	20.12.16	3/3	4,20***	0,064	1,53	4,25***	0,064	1,51	10,0***	0,064	0,64	10,15***	0,064	0,63
3	17.01.17	3/3	4,15	0,162	3,90	4,25	0,162	3,80	10,2*	0,162	1,58	10,3*	0,162	1,57
4	07.02.17	3/3	4,15	0,150	3,61	4,20	0,150	3,57	10,0**	0,150	1,50	10,1**	0,150	1,48

* Достоверност на разликите между опитната и контролната група:

* при $p < 0.05$ ** при $p < 0.01$ **** при $p < 0.001$

Таблица 5. Характеристика на коагулума

Опит №	Характеристика на коагулума																	
	Синерезис на коагулума /100 ml мляко (суроватка, ml)						СВ на суроватката,%						Киселинност на суроватката, °Т					
	Опит			Контрола			Опит			Контрола			Опит			Контрола		
	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C	X	S	C%
1	63,08 ***	0,064	0,10	61,18 ***	0,064	0,11	6,11 ***	0,105	1,72	6,55 ***	0,105	1,60	17,5 ***	0,105	0,60	16,0 ***	0,195	1,22
2	62,50 ***	0,116	0,18	60,25 ***	0,116	0,19	6,2 ***	0,064	1,04	6,7 ***	0,064	0,96	17,3 ***	0,064	0,37	16,0 ***	0,099	0,62
3	62,36 **	0,106	0,17	60,46 **	0,106	0,18	6,1 ***	0,116	1,89	6,56 ***	0,116	1,76	16,9 **	0,116	0,68	16,3 **	0,152	0,93
4	62,10 ***	0,100	0,16	60,20 ***	0,100	0,17	6,33 ***	0,106	1,67	6,82 ***	0,106	1,55	17,2 ***	0,106	0,62	16,5 ***	0,558	3,38

* Достоверност на разликите между опитната и контролната група:

* при $p < 0.05$ ** при $p < 0.01$ **** при $p < 0.001$

Получените резултати за сухото вещество в суроватката /таблица 5/ показват съществена разлика между опитната и контролна проби. Сухото вещество на суроватката в 8-те варианта проби през периода 02.12 – 07.02. при опитната партида се движи в граници от 6,10 до 6,33 %, а при контролната – от 6,55 до 6,82. Следователно в суроватката от опитната партида се получават 0,48 % по-малко загуби на сухо вещество в сравнение с контролната. Сухото вещество на суроватката през периода 06.06.17 г. до 07.10.17 г. на опитната партида се движи в границите 6,00÷6,20 %, а на контролата 6,18÷6,39 %. Загубите на сухо вещество при опитната група са 0,21 % по-малко в сравнение с тези при контролната при достоверност $p < 0.001$.

1.4.2. През летния сезон

1.4.2.1. Биологична активност (ферментационна способност) на млякото- летен сезон

Получените резултати са представени на таблица 6. Установяват се известни разлики по отношение на технологичните показатели на летния сезон в сравнение със зимния сезон. Активността на ферментационната проба е ускорена през летния сезон в сравнение със зимния със 7,2 min, сирищната коагулация е ускорена с 2,30 min, синерезисът - с 2,87min , загубите на сухо вещество в суроватката са намалени с 0,11 %.

Таблица 6. Основни биологични и технологични свойства на мляко, получено от крави хранени с дажди, съдържащи пробиотик – летен сезон (м. юни, юли, септември, октомври)*

Опит №	Дата	Колич. мляко, L Проба / Контрoла	Активност, (ферментационна проба) h						Сирична (ензимна) коагулация, min					
			Опит			Контрoла			Опит			Контрoла		
			X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%
1	02.12.16	3/3	3,4***	0,195	5,74	4,0***	0,195	4,88	9,5***	0,1	1,05	11,0***	0,195	1,77
2	20.12.16	3/3	3,0***	0,099	3,29	3,3***	0,099	2,99	10,0***	0,064	0,64	10,3***	0,099	0,96
3	17.01.17	3/3	2,45***	0,152	6,18	3,0***	0,152	5,05	8,45***	0,195	2,31	10,32***	0,152	1,47
4	07.02.17	3/3	2,45***	0,147	6,01	3,15***	0,147	4,68	8,5***	0,099	1,16	9,4***	0,147	1,57

* Достоверност на разликите между опитната и контролната група:

* при $p < 0.05$ ** при $p < 0.01$ **** при $p < 0.001$

Таблица 7. Характеристика на коагулума

Опит №	Характеристика на коагулума																	
	Синерезис на коагулума /100 ml мляко (суроватка, ml)						СВ на суроватката,%						Киселинност на суроватката, °Т					
	Опитна група			Контролна група			Опитна група			Контролна група			Опитна група			Контролна група		
	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C	X	S	C%
1	65,2 ***	0,195	0,30	60,3 ***	0,195	0,32	6,2 *	0,195	3,15	6,32 *	0,195	3,09	18,2 ***	0,195	1,07	17,0 ***	0,195	1,15
2	66,35 ***	0,099	0,15	60,5 ***	0,099	0,16	6,11 ***	0,099	1,61	6,28 ***	0,099	1,57	18,6 ***	0,099	0,53	17,1 ***	0,099	0,58
3	64,5 ***	0,152	0,23	61,2 ***	0,152	0,25	6,0 ***	0,152	2,53	6,39 ***	0,152	2,37	18,7 ***	0,152	0,81	17,4 ***	0,152	0,87
4	65,45 ***	0,147	0,23	61,5 ***	0,147	0,24	6,0 ***	0,147	2,46	6,18 ***	0,147	2,38	18,4 ***	0,147	0,80	16,8 ***	0,147	0,88

* Достоверност на разликите между опитната и контролната група:

* при $p < 0.05$ ** при $p < 0.01$ **** при $p < 0.001$

1.4.2.2. Съотношение казеин/мазнина и съотношение на общия към разтворимия белтък в млякото

Влиянието на изследваните технологични показатели на млякото върху неговите свойства, представени по-горе, зависят на свой ред от съотношението на казеин/мазнина в млякото и на съотношението на общия към разтворимия белтък. Резултатите са показани на таблици 8 и 9. От тях е видно, че през изследваните сезони се установява разлика в съотношението между белтъчното съдържание, което през зимния сезон е средно 6,14, спрямо 6,11 на контролата, а през летния 5,66 спрямо 6,0 на контролата.

Различията в съотношението се дължат предимно на повишеното количество разтворим белтък, който през зимния сезон е средно 0,55 %, а през летния – 0,59 %, както и в по-високото съдържание на общ белтък през зимния сезон в сравнение с летния.

Обобщено резултатите от изследване на влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху технологичните свойства на млякото е следното: продължителността на приема на пробиотика оказва влияние върху активността на ферментационния процес. През периода 02.12÷07.02. приеманият пробиотик ускорява ферментационния процес.

С въвеждането на пробиотика „Зоовит“ в хранителните дажби на кравите се постига ускоряване на сирищната коагулация на млякото с 11,76 % спрямо контролата с мляко без пробиотик. Пробиотикът „Зоовит“ оказва влияние върху загубите на белтък в суроватката. При еднакви условия на пастъоризация на млякото и обработка на сиренината, ефектът на намаляване на загубите е 11,8 % спрямо контролната суроватка 6,1÷6,2 %. През летния сезон активността на ферментационния процес е ускорена в сравнение със зимния с 1,33 %; сирищната коагулация е ускорена с 1,07 %; загубите на сухо вещество в суроватката са намалени с 0,11 %.

Таблица 8. Съотношение общ белтък/разтворим белтък в мляко, получено от крави, хранени с дажди, съдържащи пробиотик*

Летен сезон																		
Дати	Опитна група									Контролна група								
	Общ белтък,%			Разтв. белтък,%			Съотн. ОБ/РБ			Общ белтък,%			Разтв. белтък,%			Съотн. ОБ/РБ		
	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C	X	S	C%
15.06.2017	3,31	0,147	4,45	0,57 ***	0,011	1,84	5,8 ***	0,147	2,54	3,28	0,147	4,49	0,55 ***	0,011	1,91	5,96 ***	0,105	1,76
15.07.2017	3,3 ***	0,081	2,45	0,62 ***	0,006	0,98	5,32 **	0,081	1,52	3,12 ***	0,081	2,59	0,54 ***	0,006	1,13	5,37 **	0,061	1,13
26.09.2017	3,35 *	0,115	3,43	0,59 ***	0,012	1,95	5,67 ***	0,115	2,03	3,28 *	0,115	3,51	0,53 ***	0,012	2,17	6,18 ***	0,115	1,86
15.10.2017	3,4 ***	0,110	3,24	0,59 ***	0,011	1,87	5,76 ***	0,110	1,91	3,05 ***	0,110	3,61	0,5 ***	0,011	2,2	6,1 ***	0,110	1,81
Зимен сезон																		
Дати	Опитна група									Контролна група								
	Общ белтък,%			Разтв. белтък,%			Съотн. ОБ/РБ			Общ белтък,%			Разтв. белтък,%			Съотн. ОБ/РБ		
	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C	X	S	C%
02.12.2016	3,41	0,105	3,08	0,58 ***	0,011	1,81	5,87 ***	0,105	1,79	3,3	0,105	3,18	0,55 ***	0,011	1,91	6,0 ***	0,105	1,75
19.12.2016	3,25	0,061	1,87	0,55	0,006	1,11	6,09 ***	0,061	1,00	3,25	0,061	1,87	0,55	0,006	1,11	5,9 ***	0,061	1,03
23.12.2016	3,32 ***	0,115	3,46	0,55 ***	0,012	2,09	6,14	0,115	1,87	3,15 ***	0,115	3,65	0,51* **	0,012	2,26	6,17	0,115	1,86
20.01.2017	3,28	0,110	3,36	0,55 ***	0,011	2,00	6,14	0,110	1,79	3,28	0,110	3,36	0,53 ***	0,011	2,08	6,18	0,110	1,78

* Достоверност на разликите между опитната и контролната група: * при $p < 0.05$ ** при $p < 0.01$ **** при $p < 0.001$

Таблица 9. Съотношение на казеин/ мазнина в мляко, получено от крави, хранени с дажди, съдържащи пробиотик*

Летен сезон																		
Дати	Опитна група									Контролна група								
	Казеин, %			Мазни-на, %			Съотн. К/М			Казеин, %			Мазни-на, %			Съотн. К/М		
	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C	X	S	C%
12.06.2017	2,67 *	0,105	3,93	4,0	0,105	2,63	0,66 ***	0,011	1,59	2,61 *	0,105	4,02	3,9	0,105	2,69	0,67 ***	0,011	1,57
22.07.2017	2,62	0,061	2,32	3,8 ***	0,061	1,60	0,68 ***	0,006	0,89	2,6	0,061	2,34	2,4 ***	0,061	2,53	1,08 ***	0,006	0,56
18.09.2017	2,62	0,115	4,39	3,2 ***	0,115	3,59	0,81 ***	0,012	1,42	2,58	0,115	4,46	2,6 ***	0,115	4,42	0,99 ***	0,012	1,16
07.10.2017	2,66 ***	0,110	4,14	3,9 ***	0,110	2,82	0,68 ***	0,011	1,62	2,46 ***	0,110	4,48	3,2 ***	0,110	3,44	0,77 ***	0,011	1,43
Зимен сезон																		
Дати	Опитна група									Контролна група								
	Казеин, %			Мазни-на, %			Съотн. К/М			Казеин, %			Мазни-на, %			Съотн. К/М		
	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C%	X	S	C	X	S	C%
02.12.2016	2,67	0,105	3,93	4,2 ***	4,2	4,2	0,64 ***	0,011	1,64	2,64	0,105	3,98	3,8 ***	0,105	2,76	0,69 ***	0,011	1,52
20.12.2016	2,71 ***	0,061	2,24	3,7 ***	3,7	3,7	0,73 ***	0,006	0,83	2,58 ***	0,061	2,36	3,1 ***	0,061	1,96	0,83 ***	0,006	0,73
17.01.2017	2,8 ***	0,115	4,11	3,4 ***	3,4	3,4	0,82 ***	0,012	1,40	2,62 ***	0,115	4,39	2,8 ***	0,115	4,11	0,93 ***	0,012	1,24
07.02.2017	2,81 ***	0,110	3,92	3,9 ***	3,9	3,9	0,72 ***	0,011	1,53	2,62 ***	0,110	4,20	3,5 ***	0,110	3,15	0,74 ***	0,011	1,49

* Достоверност на разликите между опитната и контролната група: * при $p < 0.05$ ** при $p < 0.01$ **** при $p < 0.001$

2. Влияние на пробиотика „Зоовит“ върху качеството на киселото мляко, произведено по класическата технология

2.1. Технологична характеристика на киселото мляко

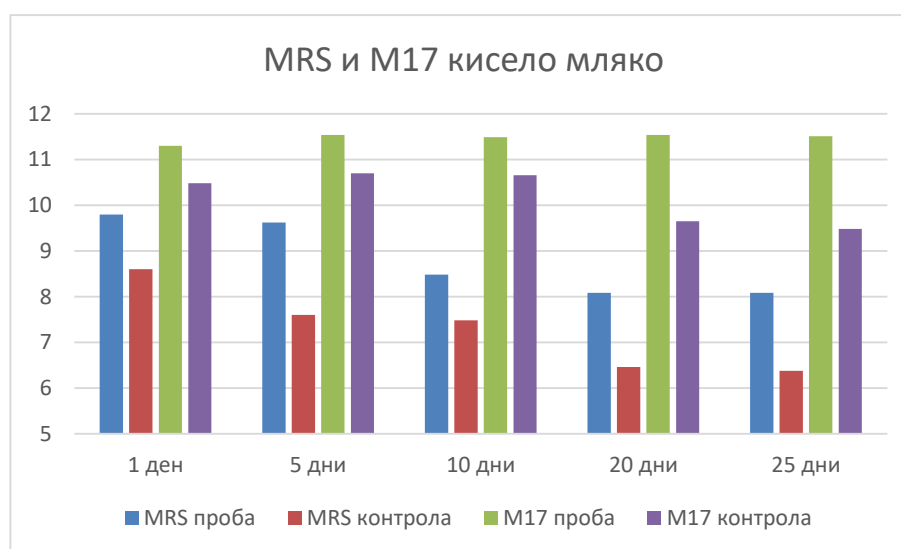
Технологичната характеристика на киселото мляко в зависимост от приема на пробиотика „Зоовит“ е направена през летния сезон след 30 дни прием. През този период се установи доказано влияние на пробиотика върху физикохимичните, микробиологични и технологични показатели на суровото мляко (таблица 10). Данните показват положително влияние на пробиотика върху общия белтък, маслеността, СБО и сухото вещество. Не се установиха разлики между двете групи по отношение на плътност, киселинност и рН.

Таблица 10. Технологичната характеристика на киселото мляко

Групи	Общ белтък, %	Масленост, %	СБО	Сухо вещество, %	Киселинност, °Т	рН	Плътност, g.cm ⁻³
Опитна	3.27	4.0	9.46	13.43	17	6.65	1.031
Контролна	3.15	3.7	8.78	12.48	17	6.65	1.030

2.2. Микробиологична характеристика на продукта

От данните на фигура 20 се вижда, че пробиотикът оказва значително влияние върху развитието на стартерните култури и съотношението им. На 24-ия час количеството на активните клетки на *Lb. bulgaricus* е $6,3 \cdot 10^9$ Cfu/g спрямо $2,0 \cdot 10^{11}$ cfu.g⁻¹ на *Str. Thermophilus*.



Фигура 20. Микробиологични изследвания на кисело мляко, получено от мляко с пробиотик в хранителните дажби на животните и контрола

2.3. Киселинообразуване при процеса на ферментация и съхранение на киселото мляко.

На таблица 11 са посочени данните за киселинността на кисело мляко, получено от мляко от крави, получавали пробиотик в дажбата, и от животните без добавка.

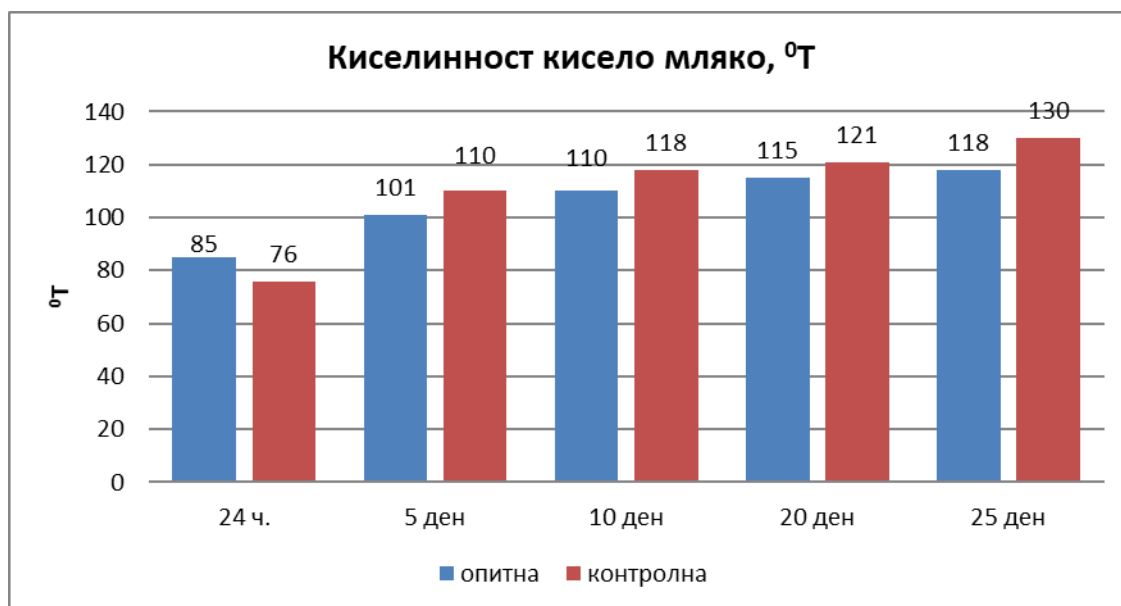
Таблица 11. Киселинност на кисело мляко, получено от мляко с пробиотик в хранителните дажби на животните и контрола

Групи	Киселинност, °Т и рН									
	24 h		5 дни		10 дни		20 дни		25 дни	
	°Т	рН	°Т	рН	°Т	рН	°Т	рН	°Т	рН
Опитна	85	4,8	101	4,7	110	4,6	115	4,55	118	4,45
Контролна	76	4,7	110	4,6	118	4,45	121	4,4	130	3,3

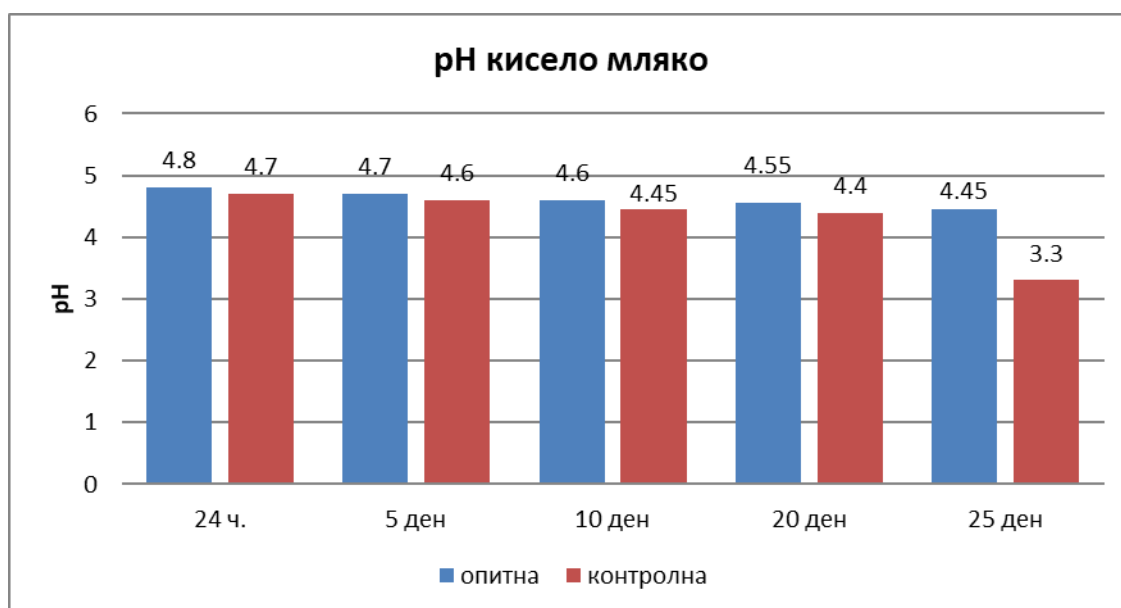
В процеса на съхраняване на млякото за периода 24 часа до 25 дни при експерименталната проба на 10-ия ден активните клетки на *Lb. bulgaricus* намаляват с една степен и съхраняват активността си на същата степен - 10^8 cfu.g⁻¹ до 25-ия ден. Активните клетки на *Str. Thermophilus* запазват съдържание си $3,2 \cdot 10^{11}$ cfu.g⁻¹ до 25-ия ден. При млякото без пробиотик активните клетки на *Lb. bulgaricus* и *Str. Thermophilus* са чувствително по-ниски и в по-късните периоди на съхранение се наблюдава съществено намаляване на количеството им на 20 и 25-ия ден.

Киселинността на киселото мляко, получено от млякото на опитните животни, се движи съответно на 24-ия час – 85 °Т, рН 4,8 и през периода 5 до 25 дни нараства от 101 °Т рН 4,7 до 118 °Т рН 4,45. За контролата киселинността на 24-ия час е 76 °Т рН 4,9 и през периода 5 до 25 дни достига киселинност съответно 110 °Т рН 4,6 до 130 °Т рН 4,3 (фигури 21 и 22).

Очевидно е влиянието на пробиотика върху микрофлората при сравнителните данни на експерименталното и контролното мляко. При контролата количеството на активната микрофлора на *Lb. bulgaricus* в процеса на съхраняване намалява с 1 до 2 степени, а количеството на микрофлората на *Str. Thermophilus* намалява с една степен в последния период на съхранение – 20÷25 дни.



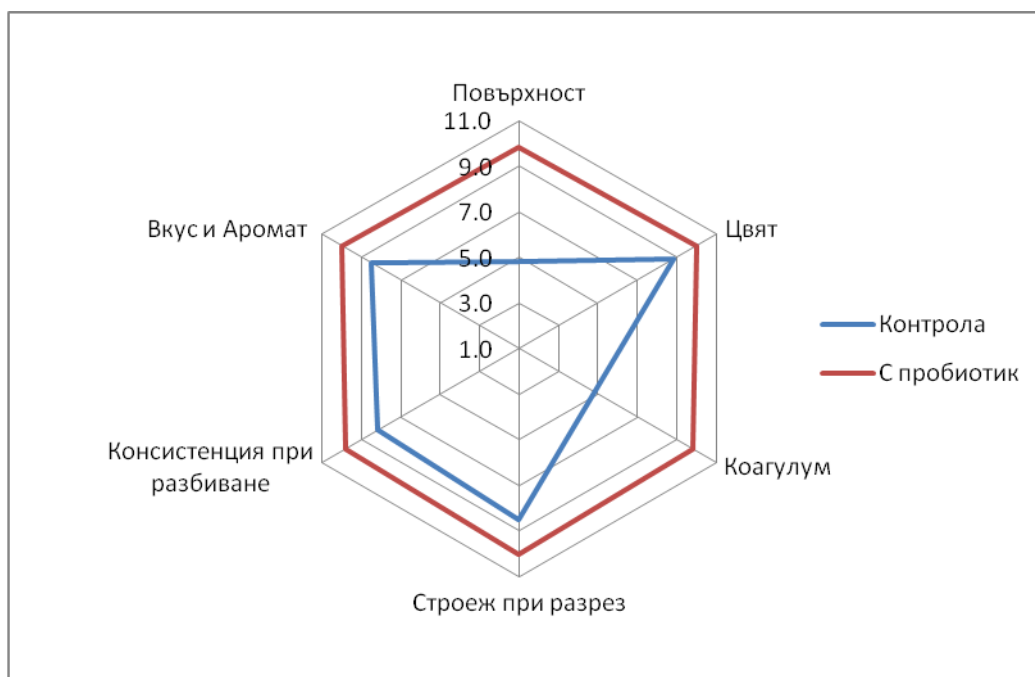
Фигура 21. Титруема киселинност на кисело мляко



Фигура 22. Активна киселинност на кисело мляко

2.4. Органолептичен анализ

Резултатите от органолептичната оценка са представени на фигура 23.



Фигура 23. Органолептична оценка на двата вида кисели мляка

Данните показват, че киселото мляко, получено от крави, получавали пробиотичния препарат, има по-добра органолептична оценка по всички показатели в сравнение с контролното мляко.

При контролното мляко се установи рехав коагулум с недобра механична устойчивост, неравна повърхност със синерезис. Вкусът е подчертано кисел и има слабо изразен аромат на диацетил.

Киселото мляко, получено от животни, приемащи пробиотичната добавка, се характеризира с гладка повърхност без синерезис, плътен и механично устойчив коагулум. Млякото има приятно изразен млечнокисел вкус и много добре развит аромат на диацетил, типични за традиционното българско кисело мляко.

Контролата мляко е с увредено качество по отношение на стабилност на структурата, вкус и аромат и увреждане с растеж на нетипична микрофлора (плесени и дрожди).

Пробиотикът „Зоовит” оказва влияние върху развитието на бактериите в стартерните култури: запазва активността на стартерните култури на киселото мляко в процеса на неговото съхраняване от 24 часа до 25 дни при температура $4 \div 6$ °C и стабилизира органолептиката си до 35 дни. Киселото мляко, произведено с мляко, добито от крави, приемали пробиотици, запазва качествените си показатели до 3 месеца, съхранявано при температура $4 \div 6$ 0C.

Таблица 12. Органолептичен анализ на кисело мляко, съхранявано в продължение на 3 месеца при температура 5 ± 1 °C.

Показатели	<i>Проба № 1</i> – контрола (без добавка на пробиотик)	<i>Проба № 2</i> – експеримент (с добавка на пробиотик)
Структура	плътна, лабилна	плътна, по-плътна от контролата
Синерезис при разрез	по-обилен при контролата Наличие на плесени на повърхността	Без плесени на повърхността
Консистенция	сравнително по-нестабилна консистенция при механично въздействие	по-стабилна в сравнение с контролата
Вкус и аромат	дрождев привкус	чист, подчертано млечнокисел вкус

3. Обобщена дискусия на резултатите на дисертационния труд

Изследователската дейност на дисертационния труд е извършена по методичен план, обхващащ комплекс от задачи с научно и приложно значение за въвеждането на пробиотици в хранителните дажби на животните.

Основно място в изследователската дейност е въпросът за качеството на млякото, неговите физикохимични и микробиологични показатели и технологични свойства, добивано от млекодайна животни – крави, поемали пробиотик „Зоовит” (захранвани) в продължение на 11 месеца, обхващащи зимния и летния сезон.

Резултатите от анализа на физикохимичните показатели на млякото показаха, че количеството на основните компоненти на млякото – белтъци и мазнини се влияе от пробиотика, като значимо по-високо е в млякото от крави, поемали пробиотик в сравнение с животните при същите условия, но без пробиотик. На свой ред се потвърждава и от по-високия процент сухо вещество на млякото, което през зимния сезон се движи от 13,31 до 14,84 %, а през летния сезон от 13,11 до 14,24 %.

Този ефект на пробиотика се наблюдава и през двата сезона – летен и зимен. По-значимо (по-високо) е съдържанието на белтъка и мазнината в млякото, получено през зимния сезон в сравнение с летния.

Този резултат показва, че климатичните условия оказват влияние върху синтеза на аминокиселини и мастни киселини. Освен това, имаме основание да предполагаме, че ензимната обработка на храната в търбуха на животните е благоприятствана от ензимната дейност на пробиотичните бактерии, съдържащи се в пробиотика. В благоприятните условия на тяхното развитие при телесната температура на животното $37,5\div 39,5$ °C те създават условия за по-активен синтез на свободните аминокиселини при формирането на белтъчната верига и триглицеридите на мастните киселини.

Влиянието на пробиотика върху микрофлората на млякото характеризира и неговия ефект върху качеството на суровото мляко и продукцията, получавана от него.

Установен е значително по-висок бактерициден ефект на пробиотика върху общия брой на микроорганизмите, обсеменяващи суровото мляко при образуването, доене и съхранение при условията на фермата.

Бактерицидният заряд, който получава суровото мляко, добивано от животни, приемали пробиотик в хранителните дажби, се дължи на пробиотичните свойства на бактериите, които се приемат с храната при благоприятната температура на развитието им. Те продуцират метаболитни вещества – млечна киселина, бактериоцини, ензими, имунни вещества, провеждат ензимно разграждане на азотните компоненти на белтъците и др.

Съвкупно метаболитните продукти на пробиотичните бактерии преминават през храносмилателната система и се заселват в дебелия черва. Доказателство за това са резултатите от PSR метод за откритите ДНК на *Lb. bulgaricus* и жива, активна микрофлора във фекалната маса на животното.

Въз основа на изследователските данни на основни технологични показатели на млякото- подсирваемата способност и обработка на подсирката, е установено важно влияние на пробиотика за ускоряване на коагулационния процес на млякото и подобряване плътността и еластичността на коагулума. Това на свой ред разкрива възможности за подобряване устойчивостта на коагулума при механизирания му обработка, неговите синерезисни свойства - предпоставка за намаляване загубата на сухи вещества от млякото в суроватката и постигане на икономически ефект при производството на млечни продукти. Сумарно получените резултати се дължат на повишаване биологичното съдържание на млякото и ускорението на ферментационния процес.

Съществена роля при развитието на ферментационния процес на млечните продукти има биологичното съдържание на ензими в млякото, които имат важно значение при зреенето на продуктите, получени от него и оформянето на тяхната органолептика. Освен това, приносите на пробиотика за реологичните

показатели - плътност и еластичност на коагулума, имат съществено значение за въвеждане на подходящи технологични подходи при механизация на процесите при производството на сирене. Очевидно е, че млякото на крави, получило по-добри биологични свойства, разкрива възможности за регулиране времето на ферментационния процес за получаване на оптимално качество на коагулума.

При еднакви други условия (температура, количество на ензима, калциеви йони и др.) времето за ензимна коагулация на млякото е по-кратко през летния сезон в сравнение със зимния. Това дава основание да се предполага, че основен фактор за ензимната обработка на храната в стомашно-чревния тракт на животните, приемащи пробиотик, са климатичните условия – въпрос, изискващ целенасочена изследователска дейност относно ускоряване процеса на агрегация на параказеиновите мицели и съответно влиянието им върху плътността и еластичността на коагулума.

Значението на получените резултати от изследване на технологичните свойства на млякото се основава на възможностите за намиране на рационални насоки и при регулиране на важни технологични фактори - количество сирищен ензим, време на коагулация, оптимални параметри на обработка на коагулума, регулиране скоростта на синерезиса чрез физикохимичните показатели на млякото – сухо вещество, плътност, еластичност на коагулума, степен на нарязване и други. Чрез регулиране скоростта на синерезиса на коагулума може успешно да се ръководи ферментационния процес – въпрос с важно значение за качеството на продуктите.

Не по-малко е значението на подхода за ръководство на скоростта на синерезиса за регулиране загубите на сухо вещество, в това число на белтъци и мазнини в суроватката. Разчетите за загубите на сухо вещество показват убедително икономическия принос на пробиотика за повишаване добива на сиренни продукти.

Научната информация относно влиянието на пробиотика „Зоовит” върху физико-химичните, микробиологичните и технологичните свойства на суровото мляко провокират интереса за установяване на неговото влияние при получаването на кисело мляко.

Киселото мляко е основен киселомлечен продукт, при който ферментационните процеси протичат сравнително по-активно в сравнение с другите продукти. Това го характеризира като продукт с най-висока възискателност спрямо качеството на изходното мляко и неговите биологични свойства.

Млякото от крави, поемали пробиотик „Зоовит”, доказано има по-добра микробиологична чистота и биологични свойства и по-високи физикохимични

показатели - количество белтък и мазнина, сухо вещество и съотношение казеин/мазнина. Всичко това благоприятства развитието на закваската на киселото мляко и съхранява по-продължително време нейната активност. Освен това, положителното влияние на пробиотиците върху технологичните свойства на млякото обуславя получаването на по-добра плътност на коагулума на киселото мляко и понижава синерезисните му свойства. Установеният технологичен ефект има сериозно въздействие и върху органолептиката на продукта и запазване на свежия му вкус при съхранение.

Резултатите от качествените показатели на киселото мляко дават основание да се препоръча ползване на пробиотик „Зоовит“ при добива на мляко за получаване на видове сирене и други млечни продукти, при които се очакват и икономически резултати от увеличението добива на продуктите.

V. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ

ИЗВОДИ:

1. Установено е влиянието на пробиотиците „Зоовит“, приеман с храната на крави, върху основни физикохимични показатели на млякото.

1.1. Количеството на белтъците в млякото се увеличава с 0,18 % през зимния сезон и 0,05 % през летния сезон, а разликата в сухото вещество за периода 02.12÷07.02. достига 1,96 %, а за периода 06.06.÷07.10 е съответно 1,26 %.

1.2. Пробиотикът „Зоовит“ не оказва съществено влияние върху количеството на мазнината и киселинността на млякото.

2. Пробиотикът „Зоовит“, приеман с хранителните дажби на кравите, оказва специфично бактерицидно влияние върху микробното съдържание на млякото.

2.1. Пробиотикът „Зоовит“, приеман през летния и зимния сезон, има специфично бактерицидно въздействие: общият брой на микроорганизмите намалява през летния сезон с 11,18 %, през зимния – 12,86%; общият брой соматични клетки - съответно – 62,22 % и 57,67 %; плесени – 16,06 % и 8,25 %; дрожди – 2,93 % и 6,37 %; ентеробактерии – 0,79 % и 2,21 %.

3. Установено е, че при въвеждането на пробиотиците „Зоовит“ в хранителните дажби на кравите се променят технологичните свойства на сирищния коагулум.

3.1. Установено е, че въвеждането в хранителните дажби на кравите на пробиотика „Зоовит“ ускорява коагулационния процес на млякото под действието на сирищния ензим с 11,76 %.

3.2. Пробиотикът „Зоовит“ оказва влияние върху загубите на белтък в суроватката. При еднакви условия на пастъризация на млякото и обработка на сиренината ефектът на намаляване на загубите на белтък в суроватката е 11,8 %.

3.3. През летния сезон активността на ферментационния процес е ускорена в сравнение със зимния с 1,33 %; сирищната коагулация е ускорена с 1,07 %; загубите на сухо вещество в суроватката са намалени с 0,11 %.

4. Установено е влиянието на пробиотика „Зоовит“ върху развитието на млечнокиселата микрофлора при получаването на кисело мляко.

4.1. Установено е, че в киселото мляко общото количество на млечнокиселите бактерии е $7.36 \div 7.54 \log \text{cfu.g}^{-1}$, получено от крави, приемали пробиотика „Зоовит“, спрямо контролната група крави - $7.17 \div 7.32 \log \text{cfu.g}^{-1}$ без пробиотик.

5. При провеждане на молекулярно-генетична идентификация посредством PCR метода чрез използване на тотална ДНК от фекална маса на крави се установи наличие на *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* при животните, получавали пробиотик.

5.1. При животни, приемащи пробиотика „Зоовит“, се установи наличие на колонии с колониална характеристика, типична за *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, което бе потвърдено чрез PCR метода. При контролната група животни не се установиха колонии, типични за *Lactobacillus bulgaricus*.

5.2. При изследване на фекална маса от крави за наличие на *Staphylococcus aureus Clostridium sp.* се установи отсъствие на бактерията, както за контролната група животни, така и при кравите, приемащи пробиотик.

5.3. При кравите, приемали пробиотик, се установи намаляване на концентрацията на активни клетки на *Escherichia coli* с две логаритмични единици, а за колиформите - с една логаритмична единица във фекалната маса в сравнение с контролната група крави.

6. Пробиотикът „Зоовит“ оказва инхибиращо въздействие върху метаболизма на бактериите в киселото мляко.

6.1. Пробиотикът, внесен в хранителните дажби на кравите, запазва активността на стартерните култури на киселото мляко в процеса на неговото съхраняване от 24 часа до 35 дни при температура $4 \div 6 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2. Киселото мляко, произведено от мляко, добито от крави, приемали пробиотици, запазва органолептичните си показатели до 3 месеца, съхранявано при температура $4 \div 6 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

ПРЕПОРЪКИ:

1. Пробиотикът „Зоовит”, приеман през летния и зимния сезон, има специфично бактерицидно въздействие (намалява общия брой микроорганизми, общия брой соматични клетки, плесени, дрожди и ентеробактерии), поради което препоръчваме да бъде добавян към дажбата на лактиращи крави.

2. **С цел подобряване** технологичните свойства на сирищния коагулум препоръчваме добавка на пробиотик „Зоовит“.

3. На база на получените резултати **препоръчваме да се използва пробиотик „Зоовит“ в дажбите на крави за подобряване качеството на българското кисело мляко.**

VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Научни приноси

1.1. Разработен е научно обоснован метод за изследване на влиянието на пробиотика „Зоовит”, приеман от крави, върху качеството на млякото и технологичните му свойства (на примера на пробиотика „Зоовит”).

1.2. Установени са параметрите на влиянието на пробиотика върху основни физикохимични, микробиологични и технологични свойства на млякото от крави, приемали пробиотик.

2. Приложни приноси

2.1. Характеризирано е технологичното и икономическо значение на пробиотика и неговото влияние върху развитието на микрофлората, качеството и технологичните свойства на млякото.

2.2. Доказано е значението на въвеждането на пробиотика в хранителните дажби на животните чрез разкриване на възможности за биологично обогатяване на млякото и продукти от него и постигане на икономически ефект с намаляване загубите на сухо вещество в суроватката.

VII. ПУБЛИКАЦИИ ПО ДЕСЕРТАЦИЯТА

1. Чавдаров, Г, 2020. Влияние на пробиотик „Зоовит” върху основни физикохимични показатели на млякото при крави от Холщайнфризийската порода. Животновъдни науки, LVII, 5, 25-33.

https://animalscience-bg.org/page/en/details.php?article_id=595