СИМБІОТИК «СУБАЕРІН»: КОМПОЗИЦІЯ, БІОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ НА МАКРООРГАНІЗМ

І. А. Бібен, канд. вет. наук, доцент,
О. І. Сосницький, д-р вет. наук, професор,
В. В. Зажарський, канд. вет. наук, доцент

Дніпровський державний аграрно-економічний університет,
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49600, Україна
bibenvet@ukr.net

Проведено експериментальне дослідження фізіологічного впливу симбіотика «Субаерін» на організм курчат-бройлерів при їх відгодівлі і здатність пробіотиків кормової добавки інгібувати транслокацію патогенної культури *E. coli* у внутрішнє середовище організму білих мишей. В результаті встановлено, що симбіотик «Субаерін» володіє активними антагоністичними властивостями проти епізоотичної культури збудника діарейного синдрому, інгібує транслокацію *E. coli* у внутрішнє середовище організму білих мишей і має позитивний фізіологічний вплив на метаболічні процеси в організмі курчат-бройлерів на відгодівлі.

Симбіотик «Субаерін» є оригінальним біопрепаратом, який використовується як кормова дієтична добавка для підвищення рівня нативної резистентності, стимуляції метаболічних процесів і нормалізації кількісного і якісного складу мікробіоти товстого кишечника. До складу кормової добавки входять ізолювані розробниками польові культури пробіотиків, а саме: виробничий штам *Aerococcus viridans* BI-07, польова сапрофітна баккультура *Bacillus subtilis* штам BI-12 і екологічний штам *Mycobacterium vaccae* «К». Пробиотичні прокаріоти були ізолювані загальноприйнятими методами від здорових тварин або зовнішнього середовища в стані інфекційного і екологічного благополуччя і відповідають видовим характеристикам, володіють активними пробіотичними потенціями, апатогенні, адаптогенні, здатні формувати колоїдні біоплівки і колоніальні скупчення на поверхні слизових оболонок кишечника, опосередковуючи регіональну неспецифічну резистентність.

Кормова дієтична добавка симбіотик «Субаерін» складається з живих культур *A. viridans* BI-07, *Bac. subtilis* BI-12, *M. vaccae* «К», взятих в рівних пропорціях, з розрахунку 10^9 ж.м.к./см³ кожного прокаріота в суспензії з відвару сіна і грибів в якості пребіотика. Суспензія готується *ex tempore* і використовується *per os* з водою або кормом в об'ємі 1 см³ один раз на добу не менше одного тижня. Період згодовування залежить від конкретної технологічної ситуації, і може бути подовжений на весь період відгодівлі. В нашому досліді цей термін складав 42 доби. Негативних наслідків зафіксовано не було. Інфектопатологія не розвинулася за відсутності застосування антибіотиків завдяки антагоністичній дії живих пробіотичних культур. Симбіотик «Субаерін» нормалізує метаболічні процеси організму курчат-бройлерів, стимулює неспецифічну резистентність слизової оболонки товстого кишечника і проявляє імуномодулюючі потенції на лімфоїдні утворення, в результаті чого добре впливає на загальний стан здоров'я тварин і покращує їх добробут.

Ключові слова: СИМБІОТИК «СУБАЕРІН», ПРОКАРІОТИ-ПРОБІОТИКИ, МЕТАБОЛІЗМ, БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ, ІНГІБІЦІЯ ТРАНСЛОКАЦІЇ, КОЛОНІЗАЦІЙНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ.

SUBAERIN SYMBIOTIC: COMPOSITION, BIOLOGICAL EFFECT ON MACROORGANISM

I. A. Biben, O. I. Sosnitskyi, V. V. Zazharskyi

Dnipro State Agrarian-Economic University
25, S. Efremova str., Dnipro, 49600, Ukraine
bibenvet@ukr.net

An experimental study of the physiological effect of the symbiotic "Subaerin" on the body of broiler chickens during their fattening and the ability of probiotics feed additive to inhibit the translocation of pathogenic culture of *E. coli* in the internal environment of white mice. As a result, it was found that the symbiotic "Subaerin" has active antagonistic properties against the epizootic culture of the pathogen of diarrhea, inhibits the translocation of *E. coli* into the internal environment of white mice and has a positive physiological effect on metabolic processes in broiler chickens for fattening.

Symbiotic "Subaerin" is an original biological product used as a dietary supplement to increase the level of native resistance, stimulation of metabolic processes and normalization of the quantitative and qualitative composition of the microbiota of the large intestine. The feed additive includes field cultures of probiotics isolated by the developers, namely the production strain *Aerococcus viridans* BI-07, field saprophytic baculture *Bacillus subtilis* strain BI-12 and ecological strain *Mycobacterium vaccae* "K". Probiotic prokaryotes were isolated by conventional methods from healthy animals or the soil and bird droppings in a state of infectious and environmental well-being and meet species characteristics, have active probiotic potencies, are pathogenic, adaptogenic, capable of forming colloidal biofilms and colonial accumulations on the mucosal mucosal region.

Feed dietary supplement symbiotic "Subaerin" consists of live cultures of *A. viridans* BI-07, *Bac. subtilis* BI-12, *M. vaccae* "K" taken in equal proportions, at the rate of 10^9 l.b.c./ml suspension in a decoction of hay and mushrooms. The suspension is prepared ex tempore and used per os with water or feed in a volume of 1 ml once a day for at least one week. The feeding period depends on the specific technological situation, and can be extended for the entire fattening period. No negative consequences were recorded.

The symbiotic "Subaerin" normalizes metabolic processes, stimulates non-specific resistance and has a good effect on the general health of animals, improves their welfare.

Keywords: SUBAERIN SYMBIOTICS, PROKARYOTES-PROBIOTICS, METABOLISM, BIOCHEMICAL RESEARCHES, INHIBITION OF TRANSLOCATION, COLONIZATION RESISTANCE.

Сучасний етап науково-технічного та соціокультурного розвитку суспільства передбачає посилення вимог до біобезпеки та комфорту середовища існування людини, підвищенню фізіологічної якості продуктів харчування, джерелом яких є сільське господарство, і в першу чергу тваринництво. Біобезпека м'ясо-молочної продукції залежить від епізоотичного благополуччя продуктивних тварин і контролю за епізоотичним процесом з метою недопущення та ліквідації інфекційних захворювань зоонозної і антропозоонозної етіології. Традиційні методи протиінфекційного захисту, засновані на масовому застосуванні антимікробних препаратів, призводять до отримання фізіологічно малоцінної і екологічно небезпечної продукції (Kremenchuc'kij, 2001; Buharin, 2006; Lizogub, 2016; Biben et al., 2017).

Багаторічне застосування антибіотиків в глобальному масштабі, негативні патофізіологічні наслідки поліантигенного і хіміотерапевтичного пресингу на адаптативно-компенсаторну систему макроорганізму, в поєднанні з технологічним і антропогенним стресом, призвели до масових явищ патофізіологічного впливу на організм

сільськогосподарських тварин і порушенні процесів саморегуляції фізіологічних функцій органів і систем, в тому числі до дисбалансу в мікробіоті товстого кишечника, пригніченні бар'єрної функції нормальної мікрофлори і заселення відкритих порожнин умовно-патогенними антибіотикорезистентними варіантами мікроорганізмів. Інтенсифікація технологічних процесів у тваринництві призводить до надмірної експлуатації господарсько-корисних властивостей макроорганізму на межі його функціональних можливостей, при цьому однією з перших ланок неспецифічної резистентності макроорганізму уражається бар'єрна функція нормальної мікрофлори, знижується її колонізаційна активність, що стимулює транслокацію умовно-патогенної транзитornoї мікрофлори, виникає можливість розвитку діарейного синдрому мікробіальної етіології. (Kremenchuc'kij, 2001; Ryzhenko, 2005; Semen, 2009; West et al., 2009; Lizogub, 2016; Reber et al., 2016).

Зміна видового і кількісного прокаріотичного складу мікробіоти товстого кишечника призводить до пригнічення імуномодуючого впливу нормальної мікрофлори, так як до 85 % лімфоїдної тканини організму зосереджено в кишечнику, стимуляція якої і здійснюється продуктами життєдіяльності нормобіоти. Також моторна функція кишечника, біохімічні процеси перетравлення і детоксикації здійснюються за участю нормальної мікрофлори. При цьому прокаріоти нормальної мікрофлори можуть перебувати як на поверхні слизової оболонки кишечника, формуючи так звану мукозну мікрофлору, так і в просвіті кишкової трубки, у вигляді порожнинної мікрофлори.

Мікроорганізми мукозного типу фіксуються на специфічних рецепторах епітеліальних клітин і формують стабільні мікроколонії, укладені в біоплівку. Подібні структури найбільш ефективно виконують бар'єрну і детоксикаційну функції в забезпеченні неспецифічної резистентності кишкової трубки (Voronin, 2002; Bucharin, 2006; Litvinov et al., 2008; West et al. 2009; Makarova, 2010; Reber et al. 2016).

З огляду на, що нормальна мікрофлора бере участь у багатьох фізіологічних процесах макроорганізму і виконує ряд життєво важливих функцій – імуномодуючу, метаболічну, дезінтоксикаційну, бар'єрну, бере участь у забезпеченні колонізаційної резистентності слизової оболонки кишечника, виникає необхідність корекції видового і кількісного складу мікробіоти, як мікробіального динамічного ефекторного органу, залежного від зовнішніх умов утримання тварини. Такі препарати – пробіотики, давно відомі, і застосовуються все більш широко, створюючи сприятливі зовнішні і внутрішні умови життєзабезпечення функціонування тваринного організму. Пробиотики застосовуються як у нативному вигляді, так і в якості кормових добавок, скомпонованих з урахуванням біологічних властивостей складових компонентів (Grin'ko et al., 2003; Litvinov et al., 2008; West et al., 2009; Makarova, 2010; Reber et al., 2016). Згідно із Законом України «Про безпечність та гігієну кормів», кормові добавки включають речовини, мікроорганізми або суміші, інші, ніж корми або премікси, які додаються до корму або води, зокрема з метою забезпечення сприятливого впливу на екологічні наслідки тваринницької діяльності, продуктивність та благополуччя тварин, шляхом впливу на шлунково-кишкову мікрофлору ... (Zakon Ukrainy «Pro bezpeku ta gighiyenu kormiv», 2018).

При виготовленні симбіотика «Субаерін», керувались нормативними документами, які регламентують критерії відбору штамів мікроорганізмів, що застосовуються для використання в складі біопрепаратів в якості пробіотиків (Dehtjarenko et al., 2007; Kotsyumbas et al., 2013). Це в першу чергу нешкідливість, апатогенність, антагоністичні властивості по відношенню до умовно-патогенної транзитornoї мікрофлори, індигенність і адаптогенність (Semen, 2009; Vlizlo et al., 2012).

На стадії підготовки біопрепаратів і при виробничих випробуваннях МОЗ України надає регламентації щодо проведення токсико-гігієнічних досліджень і визначення кардинальних біологічних характеристик (патогенності і вірулентності) виробничих штамів прокаріот, а також оптимальний обсяг експериментальних випробувань, необхідних для

надання гігієнічного регламенту пробіотика (Nakaz MOZ Ukrainy vid 26 zhovtnja 2004 roku № 521).

Мета роботи – провести лабораторні випробування симбіотика «Субаерін» на курчатах-бройлерах, визначити рівень фізіологічного впливу на функціональні потенції макроорганізму і встановити ступінь стимулюючого впливу на бар'єрну функцію кишечника, в залежності від заражаючої дози умовно-патогенних мікроорганізмів, індукуючих діарейний синдром.

Матеріали і методи. Лабораторні дослідження проводили на базі ФВМ ДДАЕУ, а саме: на обладнанні лабораторії біобезпеки і екологічного контролю продукції АПК ФВМ ДДАЕУ, лабораторії кафедри ветсанекспертизи і паразитології ФВМ ДДАЕУ, віварію ФВМ ДДАЕУ та лабораторії бактеріології Дніпровської державної регіональної лабораторії Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів. При проведенні експериментальних досліджень біологічного впливу симбіотика на організм тварин використовували загальноприйняті методики провідних фахівців з питань лабораторної діагностики, інфектопатології і клінічної пропедевтики (Mediko-biologichni doslidzhennja virobnichih shtamiv mikroorganizmiv i toksikologo-gigienichna ocinka mikrobnih preparativ, viznachennja ih bezpeki ta obgruntuvannja higienichnih normativiv i reglamentiv, Nakaz MOZ Ukrainy vid 26 zhovtnja 2004 roku № 521; Metodicheskie rekomendatsii po diagnostike zabojevanij sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh i ptitsi s ispolzovaniem serologicheskikh reaktsiy, 2008; Vlizlo et al., 2012; Kotsyumbas et al., 2013).

Бактеріологічні дослідження проводили згідно з офіційними методиками до відповідних мікроорганізмів на загальнопоживних середовищах. Ізоляцію і культуральне пасажування проводили: *Aerococcus viridans* виробничий штам BI-07, сапрофіти-антракоїди *Bacillus subtilis* штам BI-12 – польова бактеріальна культура і умовно-патогенні *Escherichia coli* – епізоотична бактеріальна культура – на МПА і МПБ; *Mycobacterium vaccae* екологічний штам «K» – на середовищі Левенштейна–Йенсена. Прокаріоти культивували в аеробних умовах за 37-38 °С, повільнозростаючі – впродовж 4 тижнів (мікобактерії), швидкозростаючі – 2-3 доби (решта). Морфо-тинкторіальні властивості визначали при фарбуванні за Грамом, а мікобактерії – за Циль-Нільсеном. Біологічні властивості культур прокаріот вивчали в біопробі на лабораторних тваринах: аерококи, сінна паличка і ешеріхії вводили внутрішньочеревно, кожну культуру 6 білим мишам, живою вагою 18-20 г, в дозі 1 см³ добової бульйонної культури з накопиченням бактеріальних клітин не менш 1×10⁹ ж.м.к./см³. Накопичення культур бактерій визначали ex tempore культуральним методом, тобто робили розведення бульйону з кроком 10 і висівали 0,3 см³ розведення бульйону в чашки Петрі з МПА. Культивували 48 год, підраховували колонії і визначали відповідне бактеріальне навантаження. Чотиритижневу культуру мікобактерій вводили в ділянку паху 4 мурчакам, живою вагою 200-250 г, в дозі 1 мг/см³. Всі культури прокаріот були апатогенними, окрім епізоотичної культури ешеріхій – з 6 білих мишей 2 загинули від септичного перебігу інфекції в інтервалі 3-5 діб, решта видужала, але всі важко перехворіли (Shevchenko et al., 2009).

При проведенні гематологічних досліджень у курчат-бройлерів відбирали кров з підкрильцевої вени і стабілізували її гепарином. Стабілізовану гепарином кров використовували для вивчення вмісту гемоглобіну, кількісної характеристики еритроцитів, лейкоцитів, встановлювали лейкоформулу і визначали гематокрит. Фагоцитарну активність лейкоцитів вивчали за методикою В.В. Чумаченко, у вигляді фагоцитарної активності нейтрофілів (ФАН) і фагоцитарного індексу (ФІ) – інтенсивності фагоцитозу нейтрофільними гранулоцитами. Функціональні потенції нейтрофільних гранулоцитів відносно ефективності фагоцитозу оцінювали за індексом Гамбургера, тобто за відсотковим показником нейтрофільних клітин, які беруть участь у фагоцитарному процесі; також за індексом Райта, а саме, за середнім кількісним показником мікроорганізмів, які були захоплені одним нейтрофілом. Оцінку функціонального стану фагоцитарного процесу проводили in vitro через 30 хв після початку інкубації з бактеріальною культурою кишкової палички. За проявом

інтенсивності фагоцитарного процесу спостерігали за показниками фагоцитарного індексу (Chumachenko et al., 1991; Voronin et al., 2002).

Для проведення біохімічних досліджень, з відібраної з підкрильцевої вени крові готували сироватку методом відстоювання, потім її центрифугували при 3000 об/хв 30 хв. В сироватці крові визначали рефрактометричним методом концентрацію загального білка; методом мікрозонального електрофорезу на ацетаті целюлози встановлювали вміст альбуміну і глобулінових фракцій; активність ферментів вивчали за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора.

Отримані в процесі дослідів кількісні показники обробляли статистичними методами, з урахуванням середніх арифметичних значень (M) чисельної сукупності даних і її квадратичних похибок (m), оцінюючи вірогідність різниці показників за критерієм Ст'юдента не менш, ніж $P \leq 0,05$. Статистично достовірними і значущими вважали експериментальні показники, рівень імовірної різниці яких був понад 95 % ($p \leq 0,05$). Розрахунки проводили на ПК з використанням пакету статистичних програм «Excel» і «Statistica 6.0» (Borovikov, 2003).

Результати й обговорення. Симбіотик «Субаерін» – це кормова дієтична добавка, яка вміщує пробіотичні культури різних видів прокаріот, ізольованих від клінічно здорових тварин і навколишнього середовища, а саме: виробничий штам *A. viridans* BI-07, польова сапрофітна культура антракоїда *Bac. subtilis* штам BI-12 і екологічний штам *M. vaccae* «K».

Бактерійна культура індигенного пробіотичного прокаріота *Aerococcus viridans* штам BI-07 була отримана від курчат-бройлерів і володіє активними пробіотичними властивостями до сільськогосподарських і домашніх тварин та птиці.

Аерококи представлені нерухомими кулястими Г+ клітинами діаметром 1,0-2,0 мкм, розташованих парами чи нерегулярними скупченнями, у мазках з культур, вирощених на рідких живильних середовищах – тетрадами. Вони факультативні анаероби, але краще ростуть у мікроаерофільних умовах. Утворюють дрібні колонії, викликаючи позеленіння кров'яного агару. Хемоорганотрофи з окисним метаболізмом; вуглеводи ферментують з утворенням кислоти. Каталазо-негативні чи злегка-позитивні. Желатин не розріджують; нітрати не відновлюють. Температурний оптимум 36 ± 1 °C (також ростуть при 10 °C, але не при 45 °C).

Сапрофіти широко розповсюджені в природі. Принципи ізоляції аерококів аналогічні як при індикації стрептококових інфекцій; бактерії утворюють білувато-сірі колонії, сформовані великими коками, зібраними в тетради чи пари. Подібно ентерококам, вони здатні рости на середовищах, що містять 6,5 % NaCl, але не ростуть при 45 °C, а також чутливі до бацитрацину.

Колонії аерококів на щільному живильному середовищі круглі, діаметром 1,0-2,0 мм у діаметрі, напівпрозорі, білі чи сірі, іноді бусинкоподібні. На кров'яному агарі колонії аерококів мають великі розміри, оточені зоною позеленіння. В МПБ утворюється гомогенне помутніння, що має тенденцію перетворюватися в зернистий осад.

Ріст штаму залежить від наявності в середовищі біотину, пантотенової і нікотинової кислот. Tween-80 замінює потребу в біотині. Штам не потребує вітамінів групи В: тіаміну, рибофлавіну, піридоксину, фолієвої і флавонової кислот. Для росту аерококів потрібні екзогенні пурини. Гуанін і ксантин взаємозамінні з аденіном. Штам не потребує екзогенних піримідинів. Потреба в амінокислотах варіабельна.

Штам при культивуванні в молоці з 1 % метиленової синьки, не відновлює останньої, підкислює молоко при відсутності згортання, желатину не розріджує, аргінін, крохмаль, ескулін не гідролізує. Аерококи продукують кислоту, але не газ при культивуванні на середовищах з глюкозою, мальтозою, лактозою, манітом, сахарозою. Ацетоїн не утворюють, рафінозу не зброджують, каталазу не продукують, коагулазу не утворюють.

При культивуванні в глюкозному (1 %) бульйоні – кінцеве рН 5,1-5,8, ріст мікроаерофільний. При аеробному рості штам продукує пероксид водню. Максимальна продукція перекису водню в культурі аерококів спостерігається в ранній період логарифмічної

фази росту. У аерококів – активних продуцентів перексиду водню, стаціонарна фаза розвитку культури – нетривала. Аерококи проявляють високу чутливість до антибіотиків.

Штам *BI-07 A. viridans* не патогенний для сільськогосподарських, домашніх і лабораторних тварин і володіє вираженими пробіотичними потенціями.

Сапрофітна культура антракоїдних бацил *Bac. subtilis BI-12* була ізольована з декокту прілого сіна висівом суспензії спор на МПА і МПБ. Культура апатогенна і володіє пробіотичними потенціями до сільськогосподарських тварин. Сінна бацила – це короткі 3-5/0,4-0,6 мкм поліморфні палички із заокругленими кінцями, іноді формують короткі ланцюжки, грампозитивні, безкапсульні, рухливі перитріхи, синтезують овальну центральну спору.

На МПА виростають сухі горбисті колонії сіро-білого кольору. В МПБ з'являється суха, зморшкувата білувата плівка, бульйон спочатку каламутний, а потім стає прозорим. Бацили чутливі до кислої реакції середовища. Оптимальна температура культивування 37 °С, але може розвиватись в діапазоні 5 – 20 °С. Культура характеризується високою протеолітичною активністю, розріджує желатин і згортає кров'яну сироватку, згортає і пептонізує молоко, виділяє сірководень, але не утворює індолу, викликає посиніння лакмусового молока і гідроліз крохмалю, розкладає гліцерин, дає кислу реакцію на середовищах з лактозою, глюкозою, сахарозою. До антибіотиків широкого спектру дії малочутливий, володіє вираженими антагоністичними потенціями проти умовно-патогенних прокаріот, апатогенний, адаптогенний.

Екологічний штам «К» *M. vaccae* був отриманий з посліду від здорових курчат-бройлерів на відгодівлі в ТОВ «Корпорація Паскаль» Сінельниківського району Дніпропетровської області, яким випоювали в якості кормової добавки 10 % гумат К і володіє активними імуномодулюючими та пробіотичними потенціями до сільськогосподарських і домашніх ссавців та птиці.

Прокаріоти *M. vaccae* штам «К» у мазках пофарбованих за методом Ціля-Нільсена мали вигляд прямих паличок, довгих і коротеньких, яскраво-червоного кольору, які розташовані у полі зору поодинокі або скупченнями. Поряд з паличками зустрічались і кокові форми.

Факультативні анаероби та мікроаерофіли, швидкозростаючі прокаріоти, адаптовані до елективних поживних середовищ, на яких культивують мікобактерії.

На яєчному щільному середовищі Левенштейна-Йєнсена культури виростили на 4 – 5 добу культивування за 25 і 37 °С, з додаванням та без 5 % NaCl (толерантність до 5 % NaCl), з утворенням пігменту жовтого кольору в темряві і на світлі. За 45 °С культура не росла (температурочутливість до 45 °С).

Культури штаму «К» були каталазоактивні, гідролізували твін-80, давали позитивну реакцію з телуритом К, проявляли амідазну активність, тобто проявляли позитивну реакцію на карбамід, нікотинамід, піроцинамід.

M. vaccae штам «К» – це екологічні сапрофіти ґрунту, входять до складу індигенної мікробіоти з вираженими імуномодуляторними та пробіотичними потенціями, убіквітарні прокаріоти широко розповсюджені в природі. Штам апатогенний для тварин, є екологічним і індигенним прокаріотом, входить до складу нормобіоти тварин.

Бактеріальні компоненти симбіотика культивували на відповідних живильних середовищах і після виходу культури на плато (стадія стаціонарного розвитку), робили робочу суспензію пробіотиків в превентивно підготовленому відварі з сіна і грибів з розрахунку 10⁹ ж.м.к. кожного прокаріота в 1 см³ декокту. Отриману кормову добавку випоювали курчатам-бройлерам по 1 см³ на добу впродовж всього періоду відкорму. Негативних наслідків зафіксовано не було. Антибіотики з профілактичною або терапевтичною ціллю не використовували. Захворювань з респіраторним або діарейним синдромом не зафіксовано. Для з'ясування якості фізіологічного впливу симбіотика «Субаерін» на метаболізм курчат-бройлерів провели скринінгові гематологічні і біохімічні дослідження стабілізованої

гепарином крові і нативної сироватки крові. Результати гематологічних досліджень крові представлені в таблиці 1, а показники біохімічного дослідження сироватки крові – в таблиці 2.

Таблиця 1

Гематологічні показники стабілізованої крові курчат-бройлерів за перорального використання симбіотика «Субаерін» в дозі 0,5 г на голову на 42 добу відгодівлі (M±m, n=80)

Групи курчат	Гематологічні показники стабілізованої крові курчат-бройлерів									
	Еритроцити, Т/л	Гемоглобін, г/л	Гематокрит, %	Лейкоцити, Г/л	Еозинофіли, %	Псевдо-еозинофіли, %	Лімфоцити, %	Моноцити, %	ФАН, %	ФІ, м.т/нейтрофіли
Дослід	2,4±0,1*	91,8±3,1*	91,8±3,1**	26,8±2,5	5,8±0,3	35,7±1,3	55,6±1,3	4,8±0,4	33,8±1,7*	11,1±0,5*
Контроль	2,2±0,1	81,2±3,7	26,3±2,1	26,8±1,9	5,5±0,3	34,2±1,3	56,7±1,3	4,7±0,4	31,2±1,0	9,8±0,7

Примітка: * – p≤0,05; ** – p≤0,01; *** – p≤0,001 відносно контролю.

Аналізуючи дані таблиці 1, можна стверджувати, що результати гематологічних досліджень вказують що показник еритроцитів, гемоглобіну і гематокриту в крові дослідних курчат на початок експерименту був вищим, ніж в контролі і зберігалася ця тенденція впродовж всього досліду до 42 доби. Також треба відмітити вищу фагоцитарну активність нейтрофілів крові дослідних курчат по відношенню до контрольних тварин, яким не згодовували пробіотичні прокаріоти, але в кінці досліду значущої різниці в гематологічних показниках лейкоцитарної ланки між контрольними і дослідними курчатами не спостерігається і показники нівелюються.

Таблиця 2

Біохімічні показники сироватки крові курчат-бройлерів за перорального використання симбіотика «Субаерін» в дозі 0,5 г на голову на 42 добу відгодівлі (M±m, n=80)

Групи курчат	Біохімічні показники стабілізованої крові курчат-бройлерів							
	Загальний білок, г/л	Альбумін, %	Глобулін, %	АлАТ, Од/л	АсАТ, Од/л	ЛФ, Од/л	ЛДГ, Од/л	Сечова к-та, мкмоль/л
Дослід	31,8±1,6*	36,2±1,9*	63,5±2,8	11,4±0,6**	302,4±19,3*	6299±518**	3522±322*	311±27*
Контроль	28,7±1,3	66,6±3,8	66,5±3,6	9,7±0,7	349,2±11,1	5322±422	3878±333	348±38

Примітка: * – p≤0,05; ** – p≤0,01; *** – p≤0,001 відносно контролю.

Аналізуючи дані показників таблиці 2 видно, що у курчат контрольної і дослідних груп реєструється постійне збільшення загального білка в сироватці крові. Стабільність співвідношення у протеїнограмі альбумін/глобулін протягом всього періоду спостереження; що зафіксовано на 42 добу, це співвідношення (альбумін/глобулін) становило близько 0,56 у курчат дослідної групи, які отримували пробіотичні прокаріоти, тоді як у курчат контрольної групи на термін закінчення досліду дорівнювало 0,48, що є значно нищим показником, в порівнянні з аналогічними даними від дослідних курчат. Спостерігаються достовірні зміни в активності лужної фосфатази. Це пояснюється фізіологічними процесами в організмі курчат-бройлерів, тому що на початку дослідного періоду ЛФ була вищою, і ця активність поступово зменшується в'язку з припиненням процесів активного росту і синтезу кісткової тканини. Встановлено, що показники АсАТ в дослідних групах є значно більш стабільними, ніж аналогічні показники в контролі. Це позитивний показник, оскільки свідчить про набагато кращий стан міокарду у дослідних курчат, ніж у контрольних. Також ми бачимо, що ЛФ поступово знижується, і одночасно спостерігається підвищення активності ЛДГ в сироватці крові курчат в контролі і досліді, що є свідченням активного накопичення м'язової тканини в цей період росту курча-бройлерів на відгодівлі.

В цілому біохімічні показники крові курчат-бройлерів вказують на більш ефективні метаболічні процеси, що опосередковано позитивно нормалізуючою дією пробіотичного компоненту симбіотика «Субаерін» при відгодівлі дослідних тварин.

Колонізаційну резистентність встановлювали в дослідях на білих мишах з інгібіцією симбіотиком «Субаерін» транслокації патогенної культури *E. coli*. Для цього підібрали 5 груп білих мишей за принципом аналогів, живою вагою 18-20 г і тиждень задавали за допомогою зонду per os симбіотик «Субаерін» з розрахунку 1 см³ на голову на добу. Контрольним мишам, 5 голів, задавали фізрозчин. Потім дослідних мишей внутрішньочеревно інфікували добовою баккультурою *E. coli* наростаючою кількістю інфектанту з кроком два: 1 гр. - 100×10⁸ ж.м.к./см³; 2 гр. - 200×10⁸ ж.м.к./см³; 3 гр. - 400×10⁸ ж.м.к./см³; 4 гр. - 800×10⁸ ж.м.к./см³; 5 гр. - 1600×10⁸ ж.м.к./см³ або 1,6×10⁹ ж.м.к./см³.

Клінічне спостереження за мишами здійснювали 7 діб, після чого мишей, які вижили, евтаназували. З крові серця (серце на лігатурі), печінки і головного мозку зробили висіви на МПА і МПБ, посіви культивували 48 год за 37-38 °С.

Білі миші процес інфікування перенесли досить легко і перші 3-5 годин були лише менш рухливими, що є наслідком маніпуляційного втручання. Згодом стресова реакція зникла, поведінка нормалізувалась і миші стали активно приймати корм. На другу добу миші 5 групи стали проявляти признаки пригнічення і цей стан патології наростав постійно. На третю добу з'явилися ознаки діарейного синдрому, депресивний стан посилювався і миші почали гинути. Захворіли миші відрізнялись хворобливим зовнішнім виглядом – скуйовдженою шерстю, пригніченим станом, атаксією, анорексією. На шосту добу загинула остання миша з цієї групи. На розтині специфічних уражень не виявлено – відмічали жовтуватий окрас печінки, незначне потовщення селезінки, невелику кількість трансудату в черевній порожнині, роздуті петлі кишечника. З крові серця, печінки і головного мозку реізолювали вихідну культуру *E. coli*.

Дослідні миші 1 і 2 груп не проявляли ніяких ознак інфекційного процесу, активно приймали корм, були рухливими. На розтині уражень внутрішніх органів не знайдено, з біоматеріалу вихідну культуру не реізолювали. Це свідчить про активну антагоністичну дію симбіотика «Субаерін» по відношенню до епізоотичної культури *E. coli*.

Деякі дослідні миші 3 і 4 груп виявили слабкі ознаки інфекційного захворювання, але це були поодинокі тварини, які згодом видужали, і вони не проявляли ознак септичного ураження і діарейного синдрому. В одній миші 5 групи знайшли абсцес у печінці, відкіля вдалось реізолювати вихідну культуру, а миша загинула. Решта мишей вижили, в процесі інфекціогенезу *E. coli* в їх організмі відмічали слабку і нетривалу пригніченість, але ознак сепсису і діарейного синдрому не зареєстрували. На розтині патологічних змін не виявлено і вихідну культуру не реізолювали.

Результати дослідів інгібіції симбіотиком «Субаерін» транслокації *E. coli* у внутрішнє середовище організму мишей відображені у таблиці 3.

Таблиця 3

Показники протективної активності симбіотика «Субаерін» в гострому досліді на білих мишах, інфікованих *E. coli* (n=6)

Заражаюча доза <i>E. coli</i>	Загинуло мишей	Кількість реізольованих культур <i>E. coli</i> з:		
		крові серця	печінки	головного мозку
100×10 ⁸ ж.м.к./см ³	0	—	—	—
200×10 ⁸ ж.м.к./см ³	0	—	—	—
400×10 ⁸ ж.м.к./см ³	0	—	—	—
800×10 ⁸ ж.м.к./см ³	1	—	+	—
1600×10 ⁸ ж.м.к./см ³	6	+++	+++	+

Примітка: + - кількість культур *E. Coli*, реізольованих від інфікованих мишей;
 — - відсутність бактерій в посівах

Аналізуючи таблицю 3, бачимо що симбіотик «Субаерін» володіє активними антагоністичними властивостями відносно патогенної культури *E. coli*. Лише інфікування мишей дуже великою заражаючою дозою призводить до їх загибелі, тому що $1,6 \times 10^9$ ж.м.к./см³ це безсумнівно летальна доза DCL (*dosis certa letalis*), яка вбиває всіх інфікованих мишей і дає 100 % летальний ефект. При цьому був уражений даже головний мозок, тобто ця епізоотична культура *E. coli* володіє нейротропними властивостями і тому є дуже небезпечною для інфікованих тварин. Але пробіотичні прокаріоти симбіотика «Субаерін» здатні захищати макроорганізм від заражаючих доз, які менше за DCL. Загибель миші в 5 групі носить неспецифічний характер, тому що ця тварина загинула від нетипової інфекційної ситуації, внаслідок індивідуальної чутливості (миші не лінійні і володіють різноманітними біологічними властивостями з різним ступенем неспецифічної резистентності).

Отже, використання кормової добавки симбіотик «Субаерін» при відгодівлі курчат-бройлерів засвідчило нешкідливість і біобезпечність препарату пробіотичних прокаріот для організму дослідних тварин. Симбіотик «Субаерін» проявив себе як нормергічний біопрепарат, який не викликає нефізіологічного виснажуючого стимулювання і метаболічної стрес-реакції. Навпаки, пробіотики діють в межах фізіологічної норми, нормалізуючи метаболічні процеси за рахунок відновлення пробіотичного складу мікробіоти товстого кишечника, що призводить до стимуляції мікробіальних процесів нормальної, індигенної мікрофлори і інгібіції транслокаторних потенцій транзиторної, умовно-патогенної мікрофлори. Як наслідок були відсутні інфектопатології з респіраторним і діарейним синдромами при повному виключенні з технологічного циклу використання антибіотиків.

ВИСНОВКИ

1. Використання кормової добавки симбіотик «Субаерін» при відгодівлі курчат-бройлерів дає можливість не застосовувати антибіотики для профілактики інфектопатології з респіраторним і діарейним синдромами у зв'язку з активною антагоністичною дією пробіотичного компоненту біопрепарату.

2. Індигенні прокаріоти нормалізують метаболічні процеси, позитивно впливаючи на фізіологічні відправлення макроорганізму при відгодівлі, стимулюють неспецифічну резистентність і підвищують протиінфекційні потенції лімфоїдної системи травного тракту, що покращує загальний стан здоров'я і добробут тварин.

3. Симбіотик «Субаерін» нормалізує кількісний і якісний склад нормальної, індигенної мікрофлори товстого кишечника, стимулює колонізаційну активність пробіотичних прокаріот і утворення біоколіїдних плівок на поверхні слизової оболонки кишечника, що призводить до преваленції нормобіоти по відношенню до транзиторної умовно-патогенної мікрофлори.

4. Прокаріотичні пробіотики симбіотика «Субаерін» підвищують колонізаційну резистентність слизової оболонки товстого кишечника і інгибують транслокацію патогенної культури епізоотичного варіанту *E. coli* у внутрішнє середовище макроорганізму.

Перспективи досліджень. Кормова добавка симбіотик «Субаерін» складається з екологічно безпечних біокомпонентів і оказує виражений позитивний ефект на організм тварин. Але є багато питань в сфері раціонального застосування біопрепарату для різних видів сільськогосподарських тварин і технологічних режимів експлуатації їх господарських якостей. Компонування біопрепарату є емпіричним і потребує подальшого удосконалення в кількісному і якісному відношенні. Є нагальна потреба підсилити позитивні потенції кормової добавки за рахунок введення нових штамів пробіотиків з іншими біовластивостями. Важливий напрям подальших досліджень – це адаптація кормової добавки для різних технологічних режимів утримання тварин.

References

- Biben, I.A., Sosnickyi, A.I., Zazharskyi, V.V. (2017). Biologicheskaya rol' *Aerococcus viridans* v biotope rotovaya polost' porosyat. Problemi zoonozhenerii ta veterinarnoï medicini: Zbirnik naukovih prac Harkivskoï derzhavnoï zooveterinarnoï akademii. Harkiv, RVV HDZVA. Veterinarni nauki. 34,2. 233 – 237. [in Ukrainian].
- Borovikov, V.P. (2003). STATISTICA: iskusstvo analiza dannyh na komp'yutere. Dlya professionalov. SPb.: Piter. 688. [in Russian].
- Buharin, O.V. (2006). Problema persistencii patogenov v infektologii. ZHurn. mikrobiol. 4. 4 – 8. [in Russian].
- Chumachenko, V.E., Vysockaya, A.M., Serdyuk, N.A., CHumachenko, V.V. (1991). Opredelenie estestvennoj rezistentnosti i obmena veshchestv u sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. K.: Urozhaj. 136. [in Ukrainian].
- Dehtjarenko, N.V., Shinkarenko, L.M., Dugan O.M. (2007). Kriterii vidboru probiotichnich shtamiv. Naukovi zapiski, 67, 30-36. [in Ukrainian].
- Grin'ko, O.M., Zverev, V.V., Kaloshin, A.A. et al. (2003). Vydelenie i izuchenie perspektivnogo probioticheskogo shtamma sporoobrazuyushchih bakterij roda Bacillus. ZHMEI. 3. 85-89. [in Russian].
- Kotsyumbas, I.Ya., Bisyuk, I.Yu., Gorzheev, V.M, Malik, O.G. et al. (2013). Klinichni doslidzhennya veterinarnih preparativ ta kormovih dobavok; za red. I.Ya. Kotsyumbasa. Lviv, 252. [in Ukrainian].
- Kremenchuc'kij, G.M. (2001). Biologichni vlastivosti A-bakterinu. Med. perspektivi. 6, 3. 90-97. [in Ukrainian].
- Lizogub, L.Yu. (2016). Izuchenie vzaimosvyazi primeneniya antibakterial'nyh preparatov v zhivotnovodstve s rostom bakterial'noj rezistentnosti u cheloveka: zb: materialiv mizhnarod. nauk.-prakt. konf. Dnipropetrovsk. 19-22. [in Ukrainian].
- Litvinov, V.I., Makarova, M.V., Krasnova, M.A. (2008). Netuberkuleznyie mikobakterii. Moskva, 256. [in Russian].
- Makarova, M.V. (2010). Vydelenie i identifikatsiya netuberkuleznyih mikobakteriy u patsientov ftiziatricheskih uchrezhdeniy: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. Moskva, 48. [in Russian].
- Mediko-biologichni doslidzhennja virobnichih shtamiv mikroorganizmiv i toksikologigigienichna ocinka mikrobnih preparativ, viznachennja ih bezpeki ta obgruntuvannja higienichnih normatyviv I reglamentiv Nakaz MOZ Ukrainy vid 26 zhovtnja 2004 roku № 521. Elecronnuj resirs/https://zakonline.com.ua/documents/show/43806_43806. [in Ukrainian].
- Metodicheskie rekomendatsii po diagnostike zabolevaniy selskohozyaystvennyh zhivotnyh i ptitsyi s ispolzovaniem serologicheskikh reaktsiy. (2008). Vladimir. [in Russian].
- Reber, S.O., Siebler, P.H., Donner, N.C. et al. (2016). Immunization with a heat-killed preparation of the environmental bacterium Mycobacterium vaccae promotes stress resilience in mice. The Rockefeller University, New Yorke. 113, 22. 3130-3139.
- Ryzhenko, S.A. (2005). Gigienicheskaya ocenka aerokokkov v mikrobiocenoze organizma cheloveka v usloviyah antropogennogo zagryazneniya okruzhayushchej sredy. Dis. ... d-ra med. nauk: 14.02.01 – gigiena. Kiev. 356. [in Ukrainian].
- Shevchenko, A.A., Shevchenko, L.V., Chernyh, O.Yu. i dr. (2009). Laboratornaya diagnostika infekcionnyh boleznej zhivotnyh. Krasnodar. 575. [in Russian].
- Semen, I.S. (2009). Systema otsinky mikroorhanizmiv pry konstruiuvanni probiotyktiv: dys. ... kand. silhosp. nauk za spetsialnistiu 03.00.20 – biotekhnolohiia / In-t biolohii tvaryn UAAN. – Lviv – Rukopys. [in Ukrainian].
- Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratich, I.B. et al. (2012). Laboratorni metodi doslidzhen u biologiyi, tvarinnitstvi ta veterinarniy meditsini: dovidnik; za red. V.V. Vlizla. Lviv: СПОЛІОМ, 764. [in Ukrainian].

Voronin, E.S., Petrov, A.M., Seryh, M.M., Dervishov, D.A. (2002). Immunologiya. M.: Kolos-Press. 408. [in Russian].

West, N.P., Pyne, D.B., Peake, J.M. et al. (2009). Probiotics, immunity and exercise: a review. Exerc. Immunol. Rev. 15(107). 107-126.

Zakon Ukrainy «Pro bezpeku ta gigiyenu kormiv», 2018. [in Ukrainian].