

потребиля новий кормовий фактор произошло достоверное повышение содержания сухого вещества в печени на 0,6–1 % и протеина – на 0,5–2,2 %, вместе с тем уровень БЭВ достоверно снизился у бройлеров 3 и 4-й опытных групп.

Ключевые слова: цыплята-бройлери, ферментный препарат, химический состав, белое мясо, красное мясо, печень.

Надійшла 18.10.2013.

УДК 606:636.6.087.8:612.015

МАЛЯР Д.Д., МЕЛЬНИЧЕНКО Ю.О., СОЛОМОНЮК Я.В., аспіранти
БІТЮЦЬКИЙ В.С., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ПРОБІОТИКІВ ТА ПРЕБІОТИКІВ НА ІМУНОЛОГІЧНІ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПЕРЕПЕЛІВ

Наведено результати досліджень з розроблення та вивчення біологічних властивостей представників пробіотиків, що є складниками біопрепарату Лактокас. Показано, що препарат має імуномодулювальну активність щодо інтенсивності фагоцитарної функції макрофагів, отриманих від перепелів дослідних груп. Встановлено, що використання в складі раціонів птиці добавок з про- та пребіотичними властивостями дає змогу суттєво стабілізувати кількісний та якісний склад симбіотичної мікрофлори кишечника.

Ключові слова: пробіотики, пребіотики, імуномодулювальна активність, лактобактерії, біфідобактерії, перепели.

Постановка проблеми. Заборона на використання антибіотиків для профілактики захворювань тварин та птиці у країнах Європи стала причиною активного пошуку оптимальних засобів, що спрямовані на профілактику виникнення дисбактеріозу і збільшують резистентність організму до несприятливих чинників зовнішнього середовища. Цим обумовлена поява на ринку продуктів синбіотиків (комбінація пробіотиків і пребіотиків) [1].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Світовий досвід засвідчує ефективність використання про- і пребіотиків, дія яких спрямована на відновлення шлунково-кишкового біоценозу, що забезпечує стабільність гомеостазу та високу збереженість молодяку тварин [2, 3].

Найбільшим попитом у біотерапії і профілактиці порушень мікробіоценозу організму людини та тварин користуються пробіотики, які регулюють нормальну мікрофлору шлунково-кишкового тракту. Однак нині для профілактики і корекції мікроекологічних порушень у травному тракті дедалі ширше впроваджуються пребіотики – речовини, які селективно стимулюють ріст і підсилюють метаболічні процеси нормальної мікрофлори кишечника [4–6]. Деякі автори вважають, що комплекси пробіотиків можна комбінувати з пребіотичними речовинами, створюючи нові біологічно активні препарати "синбіотики", в яких живі мікроорганізми поєднуються з субстратами, стимулюючими їх зростання [1]. Таким чином, виходячи зі світової тенденції до використання про- та пребіотиків як альтернативи антибіотикам дослідження у цьому напрямі є актуальними.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було вивчення впливу пробіотику Лактокас, пребіотичної композиції та їх комплексу на мікробіологічні та імунологічні показники перепелів.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проведено згідно з договором з розробником пробіотику – Інститутом мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. На препарат розроблено та затверджено Нормативно-технічну документацію [7, 8]. У дослідженнях використовували суху форму препарату Лактокас.

Лактокас – це пробіотична добавка для птиці, до складу якої входить ліофільно висушений штам *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280 – 0,30–0,60 г, желатин – 0,005–0,01 г та сахароза – 0,02–0,04 г.

Пребіотичний комплекс складається з топінамбура (*Helianthus tuberosus*) – вітчизняного інуліноносу, та відходів виробництва кукурудзи. Він складається з суміші коротколанцюгових фруктанів структури Fm та інуліну (GFn), пектину ((1→4)- α -D-галактопіранозилуранану) та ксилоолігоцукрів (β -D-ксилопіранозил-(1→4)- α -D-ксилопіраноза). Пребіотичний комплекс (ПКНКО) – однорідний порошок сірого або світло-жовтого кольору, який легко змішується з кормом. У ла-

бораторії НДІ екології та біотехнології БНАУ розроблено ресурсозберігаючу біотехнологію одержання пребіотичного комплексу, на який одержано патент України [9].

Дослідження ефективності препаратів проводили в умовах віварію Білоцерківського НАУ на перепелах породи фараон у період їх вирощування з одно- до 56-денного віку. Для експерименту сформували чотири групи – контрольну і три дослідних, по 100 голів у кожній. Птиця контрольної групи одержувала комбікорм, збалансований згідно з нормами годівлі (1 група), а перепелам дослідних груп до основного раціону додавали пробіотик (2 група), пребіотик (3 група) та їх суміш (4 група). Пробіотик Лактокас додавали перорально з питною водою у дозі $0,1 \times 10^6$ КУО на голову на добу упродовж перших 7–10 діб. Через 20 діб введення препарату повторювали. Суспензію препарату готували завжди безпосередньо перед використанням. Препарат розводили у невеликій кількості питної води, а потім поступово вносили у систему напування, яку перед використанням очищали і дезінфікували. Перепелам дослідних груп до комбікорму додавали 0,4 % ПКНКО (інулін : олігофруктоза: ксилоолігоцукри: пектин = 1:1:1:0,5).

Кров перепелів для досліджень отримували шляхом декапітації, для аналізу з групи відбирали по 5 голів. Мікробіологічні та імунологічні дослідження проводили в Інституті мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

З метою визначення впливу пробіотичних штамів мікроорганізмів на кількісний склад біфідобактерій птиці після її забою з отриманих зразків було виділено вміст та порожній фрагмент кишечника масою 1 г. Для посіву зразків у кишечнику було зроблено кратні розведення 1 г кишкового вмісту фізіологічним розчином. Крім того, було отримано змиви з фрагмента порожнього кишечника. Посів отриманих розведень матеріалу було проведено на середовище Біфідум-агар – селективне середовище для виділення та накопичення біфідобактерій. Було обрано три десятикратні розведення зразків, з кожного з яких зроблено посиви у трьох повтореннях по 100 мкл суспензії на чашку. Після культивування в анаеростаті за температури 37°C упродовж 48 год підраховували кількість колонієтвірних одиниць на чашці, враховуючи, що одна така колонія відповідає одній бактерії.

З метою визначення впливу пробіотичних штамів мікроорганізмів на кількісний склад лактобактерій у кишечнику птиці з отриманих зразків було виділено вміст та порожній фрагмент її кишечника масою 1 г. Для посіву зразків робили кратні розведення 1 г кишкового вмісту фізіологічним розчином, а також отримували змиви з фрагмента порожнього кишечника. Посів розведень матеріалу здійснювали на середовище MRSA (Man-Rogosa-Sharpe agar) – селективне середовище для виділення та накопичення лактобактерій. Було обрано три десятикратні розведення зразків, з кожного з яких були зроблені посиви у трьох повтореннях по 100 мкл суспензії на чашку. Після культивування за 37°C упродовж 48 год підраховували кількість колонієтвірних одиниць на чашці, враховуючи, що одна така колонія відповідає одній бактерії.

Моно- і полінуклеари виділяли з крові методом фракціонування клітин у градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho=1,077$ г/см). Гепаринізовану венозну кров ретельно перемішували з 0,15 М NaCl у співвідношенні 1:4. На 5 мл фікол-верографіну зверху обережно нашаровували 2 мл розведеної крові. Розподіл моно- і полінуклеарів відбувався в процесі центрифугування упродовж 15 хв за швидкості 1500 об/хв. Клітини розділялись між різними шарами в такий спосіб: між плазмою й верхнім шаром фікол-верографіну – моноцити й лімфоцити, на дні пробірки – нейтрофіли.

Функціональну активність клітин фагоцитарно-макрофагальної системи оцінювали за їх поглинальною активністю та киснезалежною бактерицидністю загальноприйнятими методами дослідження [10–13].

Суспензію макрофагів (5×10^6 клітин/мл) у культуральному середовищі (МФПЕ) по 0,2 мл наносили на покривні скельця. До МФПЕ додавали суспензію латексу (ПанЕко, Російська Федерація) у фосфатному буфері (рН 7,2) (співвідношення фагоцитів і латексу становило 1:100). Клітини культивували за 37°C упродовж 1 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Моношар клітин двічі відмивали розчином Хенкса від латексу та клітин, що не прикріпилися, й ретельно висушували. Клітини фіксували метанолом протягом 4 хв, сушили і фарбували азуроєозином за Романовським-Гімзе протягом 30 хв. У полі зору мікроскопа підраховували 100–200 клітин. Фагоцитарну активність МФПЕ оцінювали за фагоцитарним числом (ФЧ) – відносною кількістю клітин (у %), що поглинають гранули латексу, а також за фагоцитарним індексом (ФІ) – середньою кількістю частинок латексу, захоплених одним фагоцитом (в ум. од). Визначали –

фагоцитарний резерв фагоцитів (ФР) – різницю між показниками стимульованого і спонтанного нітросинього тетразолієвого тесту (ум.од.) Отримані дані оброблено статистично з визначенням ступеня вірогідності за методом Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати проведених досліджень імунологічних показників резистентності наведено в таблиці 1. Відомо, що в неспецифічній резистентності організму провідну роль відіграє система фагоцитів, від стану якої залежить не тільки елімінація інфекційного агента, але і розвиток специфічної імунної відповіді, особливо в початкових фазах її реалізації. Доведено, що моноцити та макрофаги є основними продуцентами найбільш ранніх регуляторних медіаторів клітинного імунітету – ІЛ-1 та ФНП.

Слід зазначити, що МФПЕ можуть бути чутливою тест-системою для оцінювання фагоцитарної активності під час дослідження біологічно активних речовин [10–12].

Таблиця 1 – Показники неспецифічної імунорезистентності перепелів

Група	ФЧ, %	ФІ, ум.од.	НСТ-стим., %	НСТ-спонт., %	ФР, ум.од.
1-контрольна	47,0 ± 2,93	2,2 ± 0,22	44,5 ± 4,21	29,2 ± 1,61	15,3 ± 1,73
2- дослідна	54,0 ± 3,12	2,4 ± 0,14	50,0 ± 2,43	31,7 ± 1,14	18,3 ± 2,14
3-дослідна	48,5 ± 2,54	2,1 ± 0,23	56,9 ± 3,54*	41,0 ± 1,91***	15,9 ± 1,92
4-дослідна	66,0 ± 2,63***	2,2 ± 0,25	53,7 ± 2,51	36,5 ± 2,24**	17,2 ± 2,91

Примітка: * p<0,05; ** p<0,01, ***p<0,001 порівняно з контрольною групою

Вплив культури *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280 в організмі перепелів на поглинальну здатність МФПЕ вірогідний як за показником фагоцитозу, так за інтенсивністю фагоцитарної функції макрофагів. У разі введення пробіотиків, пребіотиків та їх комплексу спостерігали стимуляцію поглинальної здатності фагоцитів відносно контрольної групи (табл. 1).

Внесені препарати мають імуномодулювальну активність щодо інтенсивності фагоцитарної функції макрофагів, отриманих від перепелів дослідних груп. Під впливом внесених препаратів поглинальна активність макрофагів (ФЧ) перепелів 2 та 3-ї дослідних груп мала тенденцію до збільшення на 14,8 та 3,2 % відповідно. Статистично достовірними були зміни у перепелів 4 групи (p<0,001). Водночас різниця між показниками фагоцитарного індексу фагоцитів (ФІ) була недостовірною. Результати досліджень функціональної активності клітин фагоцитарно-макрофагальної системи оцінювали за киснезалежною бактерицидністю: найвищими були показники у 3 та 4-й дослідних групах.

Показник фагоцитарного резерву фагоцитів був більшим у дослідних групах, максимального значення він набував у 2 та 4-й дослідних групах. Препарат *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280 здатний збільшувати поглинальну активність макрофагів, що є важливим чинником підвищення захисних сил організму перепелів. Таким чином, бактерії *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280, що належать до роду *Lactobacillus*, окремо та в комплексі з пребіотиками в організмі перепелів підвищують функціональну активність фагоцитів і впливають на їх метаболізм.

Метою мікробіологічних досліджень було вивчення кишкового мікробіоценозу птиці за використання пробіотику, визначення ефективності його застосування, а також розроблення і впровадження оптимальних схем його використання. Аналіз результатів досліджень стану кишкового мікробіоценозу показав, що кількість основних представників облигатної мікрофлори – біфідо- та лактобактерій була у межах 1,88–2,63 (змиву з порожнього кишечника), 4,38–5,47 (в 1 г вмісту кишечника) та 2,93–3,72; 5,62–6,24 log₁₀ КУО/г відповідно. У кишечнику перепелів дослідних груп відбувається достовірне зростання кількості колоній біфідобактерій – на 0,35 log₁₀ КУО/г (p<0,01), 0,17 log₁₀ КУО/г (p<0,05), 0,75 log₁₀ КУО/г (p<0,001) у 2, 3 і 4 групах відповідно. Найбільше кількість бактерій зростала у кишечнику перепелів, яким випоювали пробіотик у комплексі з пребіотичною композицією.

Крім того, спостерігали достовірне збільшення кількості колоній біфідобактерій в 1 г вмісту кишечника у дослідних груп перепелів – на 0,29 log₁₀ КУО/г (p<0,05); 0,21 log₁₀ КУО/г (p>0,05); 1,09 log₁₀ КУО/г (p<0,001) у 2, 3 та 4 групах відповідно.

Дослідженнями лактобактерій встановлено достовірне зростання загальної кількості їх колоній у кишечнику перепелів дослідних груп – на 0,59 log₁₀ КУО/г (p<0,01) (2 гр.), 0,29 log₁₀ КУО/г (p<0,05) (3 гр.), 0,79 log₁₀ КУО/г (p<0,001) (4 гр.). У 4 групі, якій випоювали пробіотик в комплексі з пребіотичною композицією, позитивний ефект був найбільш вираженим.

Дослідження кількості колоній лактобактерій в 1 г вмісту кишечника дали змогу встановити достовірне збільшення кількості колоній лактобактерій у дослідних групах, яким виводили пробіотик, додавали пребіотики та їх комплекс – на $0,46 \log_{10}$ КУО/г ($p < 0,01$) (2 гр.), на $0,12 \log_{10}$ КУО/г ($p > 0,05$) (3 гр.), на $0,62 \log_{10}$ КУО/г ($p < 0,001$) (4 гр.).

Досягнутий результат, вочевидь, слід віднести до синергічного ефекту синбіотичних складників добавок – пробіотику та наявності олігоцукрів, головним чином, низькомолекулярних: олігофруктози, ксилоолігоцукрів та пектинів, котрі відіграють важливу роль у становленні еубіозу та відновленні нормофлори кишечника. Отже, використання в складі раціонів птиці кормових добавок з про- та пребіотичними властивостями дає змогу суттєво стабілізувати кількісний та якісний склад симбіотичної мікрофлори кишечника, коригувати її біологічні властивості та персистентний потенціал.

Висновки. Використання в складі раціонів птиці кормових добавок з про- та пребіотичними властивостями дозволяє суттєво стабілізувати кількісний та якісний склад симбіотичної мікрофлори кишечника, коригувати її біологічні властивості та персистентний потенціал. Препарати мають імуномодулювальну активність щодо інтенсивності фагоцитувальної функції макрофагів, отриманих від перепелів дослідних груп.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Калініченко С.В. Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів [Текст] // *Аннали Мечниковського інституту*, 2013 (3). – С. 5–12.
2. Shenderov, B.A. Probiotics, prebiotics and synbiotics. General and selected fields of problem [Text] / B.A. Shenderov // *Food ingredients. Raw materials and additives*. – 2005. – № 2. – Р. 23–26.
3. Roberfroid M.V. Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies and products [Text] / M.V. Roberfroid, B.R. Gibson // editors. *Handbook of prebiotics*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, Taylor and Francis Group. – 2008. – Р. 39–68.
4. Засєкін Д. У СОТ та ЄС – без антибіотиків у кормах і продукції тваринництва [Текст] / Д. Засєкін, В. Прус, О. Рева // *Ветеринарна медицина України*. – 2006. – № 4. – С. 30–31.
5. Стегній, Б.Т. Застосування пробіотиків у тваринництві [Текст] / Б.Т. Стегній, С. О. Гужвинська // *Ветеринарна медицина України*. – 2005. – № 5. – С. 39–41.
6. Najati H. The Application of Prebiotics in Poultry Production [Text] / H. Najati // *International Journal of Poultry Science*. – 2010. – Vol. 9 (3) – Р. 298–304.
7. Лактокас: Технічні умови України (ТУ У) 24.4.00493712.005-2013. ОКП. 933730. / В.С. Підгорський, М.Я. Спивак, Л.М. Лазаренко, Н.О. Тимошок, О.Н. Мельниченко, В.С. Бітюцький, В.М. Зоценко, Л.П. Бабенко, В.В. Мокрозуб, О.А. Демченко, В.П. Музика, Д.Д. Маляр, Ю.О. Мельниченко, Ю.М. Шадура.
8. Настанова до застосування Лактокасу: розглянута та схвалена вченою радою ДНДКІВПКД (протокол № 2 від 12.02.2013 р.). – Затверджено Головою Державного департаменту ветеринарної медицини Міністерства аграрної політики України 04.03.03 № 15-14/130.
9. Пат. на корисну модель № 59178 у 2010 11443. Спосіб одержання інуліну, фруктоолігоцукрів та пектину шляхом біоконверсії рослинної сировини / В.С. Бітюцький, Д.Д. Маляр; заявл. 27.09.2010, опубл. 10.05.2011, Бюл. № 9.
10. Антибактеріальні й імуномодулювальні властивості штамів лакто- та біфідобактерій за експериментальної стафілокової інфекції [Текст] // В.В. Мокрозуб, Л.М. Лазаренко, Л.П. Бабенко, [та ін.]. – *Біотехнологія*, 2012. – Т. 5, №2. – С. 98–105.
11. Старовойтова С.А. Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* перспективных для создания пробиотиков [Текст] / С.А. Старовойтова та ін. // *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія*. – 2009. – Вип. 26. – С. 216–219.
12. Маянский Д. Н. Кооперативное взаимодействие клеток при иммунном ответе [Текст] // *Успехи совр. биол.* – 1982. – Т. 93, № 2. – С. 3–9.
13. Кетлинский С.А. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции воспаления и иммунитета [Текст] / С.А. Кетлинский, Н.М. Калинина // *Иммунология*. – 1995. – № 3. – С. 30–44.

Изучение эффективности применения пробиотиков и пребиотиков на иммунологические и микробиологические показатели перепелов

Д.Д. Маляр, Ю.А. Мельниченко, Я.В. Соломонюк, В.С. Битюцкий

Приведены результаты исследований по разработке и изучению биологических свойств различных представителей пробиотиков, которые являются составными компонентами биопрепарата Лактокас, разработанного в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины. Показано, что введенные препараты обладают иммуномодулирующей активностью по отношению к интенсивности фагоцитирующей функции макрофагов, полученных от перепелов исследованных групп. Установлено, что использование в составе рационов птицы кормовых добавок с про- и пребиотическими свойствами позволяет существенно стабилизировать количественный и качественный состав симбиотичной микрофлоры кишечника, скорректировать ее биологические свойства и персистентный потенциал.

Ключевые слова: пробиотики, пребиотики, иммуномодулирующая активность, лактобактерии, бифидобактерии, перепела.

Надійшла 21.10.2013.