НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ПОХИЛЬКО ЮРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 604.4: 579.64: 636.087.8: 636.92

ДИСЕРТАЦІЯ
БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВИДІЛЕНИХ З ТРАВНОГО ТРАКТУ КРОЛІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

03.00.20 – Біотехнологія
сільськогосподарські науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук. Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Ю.М. Похилько

Науковий керівник – Кравченко Наталія Олександрівна, кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник.

Біла Церква – 2022

АНОТАЦІЯ

Похилько Ю.М. **Біологічні властивості виділених з травного тракту кролів бактерій роду *Lactobacillus*, перспективних для створення пробіотичних препаратів.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. Білоцерківський національний аграрний університет МОН України, Біла Церква, 2022.

У дисертаційній роботі описано результати досліджень, спрямованих на скринінг бактерій роду *Lactobacillus*, перспективних для створення пробіотичних препаратів для кролів.

Відомо, що у період відлучення спостерігається значний падіж молодняку кролів, часто спричинений опортуністичними інфекціями. Спираючись на обмеження щодо використання антибіотиків у тваринництві для розв'язання цієї проблеми, у світі зріс інтерес до препаратів на основі живих мікробних культур – пробіотиків, що проявляють виражений профілактичний ефект щодо інфекційних захворювань шлунково-кишкового каналу. Однак пробіотики, що на сьогодні застосовуються у кролівництві є універсальними та рекомендовані для різних видів тварин. Для забезпечення максимальної ефективності пробіотичного препарату, його основу повинні складати представники облігатної мікробіоти шлунково-кишкового каналу виду тварин, для яких він використовується. Тому актуальним завданням залишається скринінг біологічно активних представників облігатної мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів.

Дослідженнями встановлено, що незалежно від типу годівлі, групою, що домінує, серед основних представників мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів є молочнокислі бактерії. Беручи до уваги велику кількість досліджень, що демонструють ефективність пробіотичних препаратів на основі бактерій роду *Lactobacillus*, селекція була спрямована на виділення активних штамів цього роду. Виділено та досліджено 250 ізолятів, що за фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками віднесені до бактерій роду *Lactobacillus*.

Ефективність пробіотику щодо профілактики шлунково-кишкових захворювань у першу чергу обумовлена антагоністичними властивостями бактерій, що входять до його складу. Антагоністична активність молочнокислих бактерій базується на двох механізмах: продукування органічних кислот (в основному, молочної) та бактеріоцинів. Ці механізми не виключають один одного, а як правило взаємопідсилюють, деякі бактеріоцини проявляють свої властивості лише в кислому середовищі. Тому попередній відбір ізолятів було проведено за значенням кислотоутворення. У дослідженнях встановлено дуже сильну кореляцію (r=0,94) між титруємою та граничною кислотністю. Більша частина ізолятів – 145 (58 %) – характеризувалися активністю кислотоутворення, яка не перевищувала 99 °Т. 35 % ізолятів проявляли кислотоутворюючу активність на рівні 100-149 °Т, 3 % – на рівні 150-199 °Т. Найвищою активністю кислотоутворення (понад 200 °Т) відзначалися 10 ізолятів (4 %), які були обрані для подальших досліджень. До облігатно-гетероферментативних були віднесені 5 ізолятів, решта – до факультативно-гетероферментативних молочнокислих бактерій.

При дослідженні антагоністичної активності молочнокислих бактерій найвищий показник встановлено в ізоляту L - 13/2, що спричиняв утворення зон інгібування росту понад 20 мм до всіх використаних у роботі тест-культур, окрім *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 і *Staphylococcus aureus* № 906.

Передумовою колонізації шлунково-кишкового каналу бактеріями є їх адгезивна активність. Встановлено, що всі досліджувані ізоляти проявляли найвищий рівень адгезії до еритроцитів крові кроля, що в середньому становив 83 %. Рівень адгезії до еритроцитів крові миші, свині, людини становив, відповідно, 75, 66, 58 %. Найнижчий рівень адгезії (51 %) відмічений до еритроцитів крові ВРХ. Експериментально виявлено високу стійкість до низьких значень pH(4,0) та високих концентрацій жовчі (40 %), натрію хлориду (5 %), гідроген хлориду (3 %) та фенолу (0,5 %) досліджуваних бактерій. Стійкість до основних метаболітів травної системи досліджуваних бактерій підвищить

здатність колонізувати товстий відділ кишківника макроорганізму за перорального ведення.

На основі досліджених пробіотичних властивостей для подальшої роботи було обрано ізолят *Lactobacillus sp.* 13/2 як найбільш перспективний. За рядом морфолого-культуральних та біохімічних ознак його було попередньо ідентифіковано до філогенетичної групи *Lactobacillus acidophilus*. За допомогою молекулярно-генетичних досліджень встановлено, що обраний ізолят не містить генів, які наявні у більшості видів *L. acidophilus* та *L. helveticus*. За аналізом нуклеотидної послідовністі фрагменту гена 16S рРНК досліджуваний штам віднесено до виду *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

Вивчення антибіотикорезистентності показало низькі значення мінімальної інгібуючої концентрації до ампіциліну, бензилпеніциліну, еритроміцину, тетрацикліну та стрептоміцину для досліджуваних бактерій. Виявлено стійкість до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти, однак більшість видів молочнокислих бактерій не здатна до горизонтального перенесення генів антибіотикорезистентності.

Під час дослідження вірулентних властивостей клітин встановлено, що штам *Lacticaseibacillus rhamnosus* 13/2 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, що не здатні до інвазії у внутрішні органи лабораторних тварин.

На модельних дослідах за використання білих лабораторних мишей доведено, що профілактичне введення штаму *Lacticaseibacillus rhamnosus* 13/2 дає змогу підвищити збереженість дослідних тварин до 90-100 % при зараженні збудниками сальмонельозних інфекцій. Також позитивний ефект виявлено при введенні досліджуваного штаму після інфікування бактеріями роду *Salmonella*, залежно від збудника збереженість становила 67-73 %.

Продемонстровано ефективність використання досліджуваного штаму для відновлення та корекції мікробіоти кишечника кролів. На 14-й день пролонгованого введення відмічено збільшення кількості біфідобактерій та

молочнокислих бактерій у дослідних тварин, що отримували 10 і більше мл/л води бактеріальної суспензії.

За результатами випробувань встановлено ефективність додавання штаму *Lacticaseibacillus rhamnosus* 13/2 до раціону під час відлучення кроленят. При цьому знижується смертність та витрати корму на 9,56 % та 9,00 % відповідно. Внаслідок чого недоотриманий прибуток у дослідній групі знизився на 277,08 грн. (75 %). При перерахунку на 1 голову, недоотриманий прибуток становив 2,79 грн та 13,99 грн у дослідній та контрольній групах, відповідно.

Ключові слова: пробіотики, молочнокислі бактерії, антагонізм, адгезія, кролі, мікробіота шлунково-кишкового каналу.

SUMMARY

Pokhylko Yu.M. **Biological properties of bacteria of the genus *Lactobacillus* isolated from the digestive tract of rabbits, promising for the creation of probiotic preparations.** – The qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation is for a Candidate Degree in Agricultural Sciences, specialty 03.00.20 – biotechnology. – Bila Tserkva National Agrarian University, Ministry of Education and Science of Ukraine Bila Tserkva, 2022.

The dissertation presents the results of studies aimed at screening bacteria of the genus *Lactobacillus*, promising the creation of probiotic preparations for rabbits.

It is known that during the weaning period there is significant mortality of young rabbits, often caused by opportunistic infections. Based on the limitation of the use of antibiotics in animal husbandry to solve this problem, there has been a growing interest in drugs based on live microbial cultures - probiotics - that show a pronounced preventive effect against infectious diseases of the gastrointestinal tract. However, probiotics used today in rabbit breeding are universal and recommended for various types of animals. To ensure the maximum effectiveness of a probiotic preparation, it should be based on representatives of the obligate microbiota of the gastrointestinal tract of the animal species for which it is used. Therefore, screening of biologically

active representatives of the obligate microbiota of the gastrointestinal tract of rabbits remains an urgent task.

Studies have established that, regardless of the type of feeding, lactic acid bacteria are the dominant group among the main representatives of the microbiota of the gastrointestinal tract of rabbits. Taking into account the large number of studies demonstrating the effectiveness of probiotic preparations based on bacteria of the genus *Lactobacillus*, the selection was aimed at isolating active strains of this genus. There were isolated and investigated 250 isolates, which were attributed to bacteria of the genus Lactobacillus by physiological-biochemical and morphological-cultural characteristics.

The probiotic's effectiveness in preventing gastrointestinal diseases is primarily due to the antagonistic properties of the bacteria that make up its composition. The antagonistic activity of lactic acid bacteria is based on two mechanisms: the production of organic (mainly lactic acid) acids and bacteriocins. These mechanisms are not mutually exclusive, but, as a rule, mutually reinforce, some bacteriocins show their properties only in an acidic environment. Therefore, the preliminary selection of isolates was carried out according to the value of acidification. Studies have found a very strong correlation (r = 0.94) between titratable and limiting acidity. Most of the isolates - 145 (58 %) - were characterized by acid formation activity, and did not exceed 99 °T. 35 % of isolates exhibited acid-forming activity at the level of 100-149 °T, and 3 % - at the level of 150-199 °T. For the most acid-forming activity (more than 200 °T), 10 isolates (4 %) were noted, which were selected for further research. Five isolates were classified as obligate-heterofermentative, and the rest were classified as facultative-heterofermentative lactic acid bacteria.

In the study of the antagonistic activity of lactic acid bacteria, a high indicator was found in isolate L - 13/2, which caused the formation of growth inhibition zones of more than 20 mm for all test cultures used in this work, except for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 and *Staphylococcus aureus* № 906.

The cause of colonization of the gastrointestinal tract by bacteria is their adhesive activity. It was found that all the investigated isolates showed a high level of adhesion

to rabbit erythrocytes, an average of 83 %. The level of adhesion to mouse, pig, and human erythrocytes was 75, 66, and 58 %, respectively. The lowest level of adhesion (51 %) was observed in cattle erythrocytes. High resistance to low pH values (4.0) and high concentrations of bile (40 %), sodium chloride (5 %), hydrogen chloride (3 %), and phenol (0.5 %) of the studied bacteria were experimentally revealed. Resistance to the main metabolites of the digestive system of the studied bacteria will increase the ability to colonize the large intestine of the macroorganism after oral administration.

Based on the probiotic properties investigated, the isolate *Lactobacillus sp.* 13/2 was selected for further research as the most promising. Several morphological, cultural, and biochemical characteristics identified it in the phylogenetic group of *Lactobacillus acidophilus*. Based on molecular genetic studies, it was found that the selected isolate does not contain genes that are found in most species of *L. acidophilus* and *L. helveticus*. According to the analysis of the nucleotide sequence of the fragment of the 16S rRNA gene, the studied strain belongs to *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

The study of antibiotic resistance showed low values of the minimum inhibitory concentration to ampicillin, penicillin, erythromycin, tetracycline, and streptomycin for the studied bacteria. Revealed resistance to oxacillin, kanamycin, streptomycin, and nalidixic acid, however, most species of lactic acid bacteria are not capable of horizontal transfer of antibiotic resistance genes.

When studying the virulent properties of cells, it was found that the *Lacticaseibacillus rhamnosus* 13/2 belongs to the group of avirulent microorganisms that are not capable of invading the internal organs of laboratory animals.

In model experiments for the use of white laboratory mice, it was proved that the prophylactic administration of the *Lacticaseibacillus rhamnosus* 13/2 allows an increase in the safety of experimental animals by up to 90-100 % when infected with salmonella pathogens. Also, a positive effect was revealed with the introduction of the test strain after infection with bacteria of the genus Salmonella, depending on the pathogen, the safety was 67-73 %.

The effectiveness of the use of the investigated strain for the restoration and correction of the microbiota of the intestine of rabbits has been demonstrated. On the

14th day of prolonged administration, an increase in the number of bifidobacteria and lactic acid bacteria was noted in the experimental animals receiving 10 or more ml/l of water of the bacterial suspension.

According to the test results, a positive effect was found from the use of the *Lacticaseibacillus rhamnosus* 13/2 at the time of weaning of rabbits. As a result, mortality and feed costs are reduced by 9.56 % and 9.00 %, respectively. Due to this, the lost profit in the experimental group decreased by 277.08 UAH (75 %). When recalculated for 1 head, the lost profit amounted to 2.79 UAH and 13.99 UAH in the research and control groups, respectively.

Keywords: probiotics, lactic acid bacteria, antagonism, adhesion, rabbits, the microbiota of the gastrointestinal tract.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О., Божок Л.В., Агеєв В.О., Дмитрук О.М. Особливості кишкового мікробоценозу молодняку кролів за різних типів годівлі. Сільськогосподарська мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. 2015. Вип. 22. С.48–52. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

2. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Склад мікробоценозу шлунково-кишкового тракту молодняку кролів залежно від раціону. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок та Інституту біології тварин. 2016. Вип. 17, № 1. С.141–146. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

3. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Вплив середовища культивування на антагоністичну активність молочнокислих бактерій Сільськогосподарська мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. 2016. Вип. 24. С.64–72. (Дисертант

виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

4. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Виділення із травної системи кролів молочнокислих бактерій, перспективних для створення пробіотичних препаратів. Біоресурси і природокористування. 2016. Том 8, № 5-6. С.63–66. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

5. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Відновлення та корекція балансу мікробіоти шлунково-кишкового тракту кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків. Біоресурси і природокористування. 2018. Том 10, № 3-4. С.19–31. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

6. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О., Шаховніна О.О. Ефективність використання молочнокислих бактерій у технології вирощування кролів. Сільськогосподарська мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб, 2020. Вип. 32. С.74–80. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

Статті в інших наукових виданнях України:

7. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Стійкість бактерій роду *Lactobacillus* до метаболітів травної системи. Мікробіологія і біотехнологія. 2017. № 2 (38) С.101-111. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

8. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Пробіотичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів. Біологічні студії. 2018. Т. 12, № 1. С.35–46. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

9. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Індентифікація та антибіотикорезистентність молочнокислих бактерій, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроля. Sciencerise: biological science. 2019. №2(17). С.31–38.

(Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

Статті у закордонних виданнях:

10. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Бактерії роду *Lactobacillus*, виділені зі шлунково-кишкового тракту кроля, як основа пробіотичного препарату для лікування та профілактики сальмонельозних інфекцій. Acta carpathica. 2015. № 24. P.177–184. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

Матеріаликонференцій, конгресів та з'їздів:

11. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Антагоністична активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів. Біотехнологія: звершення та надії: матеріали V Всеукраїнської науковопрактичної конференції, 12–13 травня 2016 року тези доп. Київ: НУБіП, 2016. С.118–119.

12. **Yu. Pokhylko**, N. Kravchenko. Bacteria of the genus *Lactobacillus* as the basis of probiotic preparations for rabbits. Molecular microbiology and biotechnology: матеріали Міжнародної науково-практичної конференції , 21–23 червня 2016 року тези доп. Одеса: ОНУ ім. І.І. Мечникова, 2016. С.37.

13. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Антибіотикоризистентність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XI наукової конференції молодих вчених, 5-6 жовтня 2016 року тези доп. Чернігів, 2016. С.50–53.

14. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Перспективи використання пробіотиків у кролівництві. Стан природних ресурсів, перспективи їх збереження та відновлення : збірник матеріалів III Міжнародної науково-практичної конференції, 12–14 жовтня 2016 року тези доп. Дрогобич, 2016. С.110–112.

15. **Yu. Pokhylko**, N. Kravchenko. Properties of probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of rabbits. Молодь і поступ біології : збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, 25–27 квітня 2017 року тези доп. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2017. С.215.

16. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Використання молочнокислих бактерій, як засіб профілактики сальмонельозних інфекцій. Наукове забезпечення інноваційного розвитку агропромислового комплексу в умовах змін клімату: матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів, 25-26 травня 2017 року тези доп. Дніпро: НААН, ДУ ІЗК НААН, М-во аграр. Політики та природ. України, Укр. Ін-т експертизи сортів рослин., 2017. С.190–191.

17. Похилько Ю.М. Скринінг бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів, перспективних для створення пробіотичних препаратів. XV з'їзд товариства мікробіологів україни ім. С.М. Виноградського: тези доповідей XV з'їзду товариства мікробіологів україни ім. С.М. Виноградського, 11–15 вересня 2017 року тези доп. Одеса: ОНУ ім. І.І. Мечникова, 2017. С.223.

18. **Похилько Ю.М.**, Кравченко Н.О. Протеолітична активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XII наукової конференції молодих вчених, 24-25жовтня 2017 року тези доп. Чернігів, 2017. С.45–47.

19. Yu.Pokhylko. Influence of bacteria of the genus *Lactobacillus*, on the productivity of young rabbits. Microbiology and immunology – the development outlook in 21st century: abstract book III international scientific conference, 19-20 april 2018 year: theses of the report Kyiv, 2018. P.83–84.

20. Похилько Ю.М. Адгезивна активність бактерій роду *Lactobacillus*, перспективних для створення пробіотичних препаратів. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XIII наукової

конференції молодих вчених, 24-25жовтня 2018 року тези доп. Чернігів, 2018. С.104–107.

21. Yu. Pokhylko. Use of the strain *Lactobacillus sp.* 13/2 for growing rabbits. Conference materials of the young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”, 12-14 November 2019 year: theses of the report Kyiv, 2019. P.29.

22. Похилько Ю.М. Технологія отримання кормової добавки для кролів на основі штаму *Lactobacillus sp.* 13/2. Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XIV наукової конференції молодих вчених, 27-28 жовтня 2020 року: тези доп. Чернігів, 2020. С.162–164.

23. Похилько Ю.М. Збереженість поголів’я молодняку кролів за дії *Lactobacillus sp.* 13/2. Біологічні процеси оптимізації продукційного процесу культурних рослин: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 60-річчю ІСМАВ НААН, 26–27 жовтня 2021 року: тези доп. Чернігів, 2021. С.152–154.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……. 15

ВСТУП…… 16

РОЗДІЛ 1. ЗНАЧЕННЯ КИШКОВОЇ МІКРОБІОТИ, ПОРУШЕННЯ ЇЇ БАЛАНСУ ТА СПОСОБИ ВІДНОВЛЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)…….. 22

1.1. Роль та склад кишкової мікробіоти кролів……. 22

1.2. Поняття дисбактеріозу мікробіоти шлунково-кишкового каналу, його причини та наслідки……. 27

1.3. Пробіотичні препарати та їх застосування в кролівництві……... 33

1.4. Біологічні властивості молочнокислих бактерій як потенційних мікроорганізмів для пробіотичних препаратів……... 37

1.5. Висновки щодо огляду літератури та обґрунтування напрямів досліджень…….. 44

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ……. 45

2.1. Мікробіологічні дослідження……... 45

2.2. Дослідження на тваринах…… 51

2.3. Розрахунок економічної ефективності вирощування молодняку кролів при використанні МКБ……. 55

2.4. Статистичні методи обробки результатів……... 55

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ…… 57

3.1. Склад мікробіоти ШКК молодняку кролів за різних типів годівлі та дієти…… 57

3.2. Скринінг молочнокислих бактерій…….. 62

3.2.1. Виділення бактерій роду *Lactobacillus* зі шлунково-кишкового каналу……. 62

3.2.2. Дослідження кислотоутворюючої активності МКБ……... 64

3.2.3. Параметри росту та протеолітична МКБ…… 67

3.2.4. Дослідження можливості сумісного культивування МКБ……... 69

3.2.5. Антагоністична активність МКБ……..…..…… 70

3.2.6 Вплив кислотоутворення та середовища культивування на антагоністичну активність МКБ…….…… 75

3.2.7. Адгезивна активність МКБ …… 77

3.2.8. Стійкість МКБ до метаболітів травної системи…….… 79

3.2.9. Антибіотикорезистентність МКБ…… 86

3.2.10. Ідентифікація досліджуваних ізолятів …….....……..... 89

3.2.10.1. Фізіолого-біохімічні властивості бактерій роду *Lactobacillus* ……. 89

3.2.10.2. Видова ідентифікація бактерій роду *Lactobacillus* за спектром фізіолого-біохімічних властивостей ……... 90

3.2.10.3. Молекулярно-генетична ідентифікація штаму L-13/2……... 92

3.3. Вплив штаму *L. rhamnosus* 13/2 на макроорганізм……..... 95

3.3.1. Визначення безпечності штаму *L. rhamnosus* 13/2 …… 95

3.3.2. Ефективність використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 для профілактики сальмонельозних інфекцій……...…… 98

3.3.3. Відновлення та корекція балансу мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків, за використання штаму *L. rhamnosus* 13/2……..... 103

3.3.4. Оцінка ефективності штаму *L. rhamnosus* 13/2 при відгодівлі кролів…….. 110

3.4. Економічна ефективність вирощування молодняку кролів при використанні *L. rhamnosus* 13/2 …….. 113

3.5. Розробка технології отримання кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2 …….. 116

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ…….. 119

ВИСНОВКИ……..... 129

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ…….……. 131

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……. 132

ДОДАТКИ……. 179

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

FAO – Організації з питань продовольства та сільсько-господарської продукції ООН (від англ. FAO – The Foog and Agriculture Organization of Organization of the United Nations);

MRS – середовище Man-Rogosa-Sharpe;

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров’я;

ВРХ – велика рогата худоба;

ДСТУ – державний стандарт України;

ЗЗР – зона затримки росту;

КУО – колонієутворююча одиниця;

МІК – мінімальної інгібуючої концентрації;

МКБ – молочнокислі бактерії;

МПА – м’ясо-пептонний агар;

МПБ – м’ясо пептонний бульйон;

ОЩ – оптична щільність;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

ПА – показник адгезії;

ШКК – шлунково-кишковий канал.

ВСТУП

Актуальність теми. Кролівництву, на сьогодні, приділяється мало уваги, однак ця галузь тваринництва залишається однією з найперспективніших в Україні [277, 300, 397]. Цьому сприяють виняткові біологічні та господарсько-корисні особливості кролів, серед яких найціннішими є висока плідність, скоростиглість, рентабельність кормів, доступність та невибагливість до умов утримання для широких верств населення. У кролівництві використовуються різні технології, однак технологією, що переважає є ретро-кролівництво [339]. Дана технологія заснована на традиційних способах ведення та придатна для невеликого селянського подвір’я, розрахованого на невелику кількість тварин. При цьому застосовуються найпростіші способи утримання кролів, раціон орієнтований на кормову базу селянського подвір’я, а тварини, як правило, не захищені від спалахів інфекцій.

В Україні основна частка (94,5 %) поголів’я кролів припадає на господарства населення, а решта 5,5 % на сільськогосподарські підприємства. На сьогодні спостерігається зниження виробництва, порівнюючи з періодом 2000 – 2014 років та надзвичайний спад порівняно з 1980 роком [220].

Серед основних проблем, які заважають ефективному веденню кролівництва, особливе місце займають шлунково-кишкові захворювання тварин. Кролі є виключно травоїдними тваринами, тому мають розвинений шлунково-кишковий тракт, пристосований до перетравлювання грубого волокнистого корму. Важливу роль у травленні кролів відіграє мікробіота шлунково-кишкового тракту, яка здатна перетравлювати елементи корму, що є недоступними для травних ферментів та підвищувати засвоюваність кормів [324, 356]. Також особливої уваги потребує питання збереження молодняку під час відлучення від кролематок. Саме в цей період спостерігається найактивніший падіж, внаслідок сильного стресу кроленята найбільш уразливі до дії патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Це пов'язано з одного боку з різкими

змінами у перші дні життя кроленят типів годівлі, а з іншого – з їх ще не до кінця сформованим травним апаратом та імунною системою [387].

У зв’язку з цим упродовж останніх років у світі та Україні зріс інтерес до бактеріальних препаратів на основі живих мікробних культур – пробіотиків. Найчастіше до складу таких препаратів входять молочнокислі бактерії. Характерна властивість молочнокислих бактерій – здатність продукувати речовини, що мають виражену антибіотичну активність. Бактерії цієї групи проявляють антагонізм до різних груп мікроорганізмів, у тому числі патогенних та умовно-патогенних [37, 181, 302, 347].

Однак пробіотики, що застосовуються у кролівництві, мають у своєму складі бактерії, виділені з різних еконіш. Такі препарати є універсальними та рекомендовані для різних видів тварин, у тому числі й кролів. Відомо, що прояв біологічних властивостей мікроорганізмів часто обумовлений джерелом їх виділення. Зокрема, було показано, що представники одного й того ж виду мікроорганізмів, виділених з різних еконіш, проявляють різну біологічну активність [334]. У зв’язку з цим актуальним залишається створення пробіотичного препарату на основі біологічно активних представників облігатної мікробіоти шлунково-кишкового тракту саме цих тварин.

У науковій літературі практично відсутні дані щодо пробіотичних властивостей молочнокислих бактерій, виділених від кролів. Враховуючи вищезазначене, вивчення біологічних властивостей нових штамів молочнокислих бактерій, виділених від кролів, є актуальним завданням.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було вивчити біологічні властивості молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового каналу кролів та оцінити перспективу створення на їх основі пробіотичного препарату.

Для досягнення даної мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити особливості складу мікробіоти кишківника кролів за різних типів годівлі. Встановити вплив раціону на баланс кишкової мікробіоти кролів.

2. Виділити з травного тракту кролів молочнокислі бактерії та селекціонувати найбільш перспективні за морфологічними, фізіолого-біохімічними, адгезивними властивостями, кислотоутворюючою та антагоністичною активностями, стійкістю до метаболітів травної системи, стійкістю до антибактеріальних препаратів.

3. Дослідити ефективність застосування селекціонованих молочнокислих бактерій у дослідах *in vivo* для:

- профілактики сальмонельозних інфекцій;
- відновлення балансу мікробіоти кишківника кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків.

4. Встановити вплив селекціонованого штаму молочнокислих бактерій на продуктивність та збереженість поголів'я кролів за промислового вирощування.

5. Розробити технологічну схему отримання пробіотичного препарату (кормової добавки) на основі селекціонованого штаму молочнокислих бактерій.

6. Розрахувати економічну ефективність використання новоствореної пробіотичної кормової добавки.

Об'єкт досліджень – взаємодія молочнокислих бактерій з макроорганізмом.

Предмет досліджень – біологічні властивості молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового каналу кролів.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено якісний та кількісний склад мікробіоценозу ШКК кролів за різних типів годівлі та раціону, що дає можливість глибше зрозуміти адаптаційні можливості мікробіоти кишківника кролів. На основі вивчення морфологічних, фізіолого-біохімічних, адгезивних властивостей, кислотоутворюючої та антагоністичної активностей, стійкості до метаболітів травної системи та інших біологічних особливостей запропоновано перспективний штам *L. rhamnosus* 13/2, що проявив найбільш широкий спектр пробіотичних властивостей. Науково обґрунтовано та експериментально підтверджено доцільність використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 з метою профілактики зараження дослідних тварин бактеріями роду *Salmonella*, що забезпечує збереженість від 67 до 100 % тварин. Доведена

здатність штаму *L. rhamnosus* 13/2 до корекції балансу кишкової мікробіоти лабораторних тварин після антибіотикотерапії, що сприяє швидкому відновленню чисельності біфідобактерій та лактобактерій.

Встановлено, що використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 як основи пробіотичної кормової добавки за промислового вирощування кролів, приводить до зниження смертності та економії кормів, позитивно впливає на продуктивність молодняку кролів.

Отримані результати розширюють сучасні уявлення про вплив на макроорганізм пробіотиків, біоагентами яких є молочнокислі бактерії.

Практичне значення одержаних результатів. Селекціоновано перспективний пробіотичний штам *L. rhamnosus* 13/2, на основі якого створено пробіотичну кормову добавку для кролів.

Запропонований штам *L. rhamnosus* 13/2 задепоновано у депозитарії Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного Національної академії наук України за № *Lactocaseibacillus rhamnosus* ІМВ В-7979.

Розроблено та затверджено регламент на виробництво кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2.

Застосування пробіотичної кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2 для кролів, що знаходяться на відгодівлі, сприяє відновленню та/або корекції балансу мікробіоти кишківника, профілактиці шлунково-кишкових інфекцій, підвищує збереженість поголів’я до 97 %, зменшує витрати корму із розрахунку на 1 кг приросту живої маси до 9 %.

Використання кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2 під час вирощування молодняку кролів забезпечує позитивний економічний ефект: при збільшенні вартості реалізованої продукції на 1 гол. на 4%, собівартість 1 кг приросту та недоотриманий прибуток знижуються на 9 і 75 %, відповідно.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційну роботу виконано особисто автором у лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України (ІСМАВ НААН України). Здобувачем самостійно підготовлено огляд літератури з тематики досліджень,

проведено виділення та відбір молочнокислих бактерій, здійснено визначення фізіолого-біохімічних властивостей ізольованих культур, проведено ідентифікацію виділених штамів з використанням мікробіологічних методів, досліджено їх антагоністичні та адгезивні властивості, стійкість до антибіотиків та умов шлунково-кишкового каналу, визначено позитивний вплив на макроорганізм.

Планування роботи, аналіз отриманих результатів експериментів та формулювання окремих положень дисертації автором здійснено за участі наукового керівника роботи, к. вет. н., с. н. с. Кравченко Н. О.

Молекулярно-генетичну ідентифікацію нового перспективного ізоляту *Lactobacillus sp.* 13/2 проведено спільно із завідувачем відділу молекулярної біології Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів Дерябіним О. М.

Оцінку ефективності штаму *L. rhamnosus* 13/2 при відгодівлі кролів проведено спільно з головним агрономом ПП “ВИМАЛ - АГРО” Голубенком С. В.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації було представлено на: V всеукраїнській науково-практичної конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2016), міжнародній науково-практичної конференції «Molecular microbiology and biotechnology» (Одеса, 2016), XI, XII, XIII науковій конференції молодих вчених «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (Чернігів, 2016, 2017, 2018, 2020), III Міжнародній науково-практичної конференції «Стан природних ресурсів, перспективи їх збереження та відновлення» (Дрогобич, 2016), XIII міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 2017), міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Наукове забезпечення інноваційного розвитку агропромислового комплексу в умовах змін клімату» (Дніпро, 2017), XV з’їзді товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Одеса, 2017), III international scientific conference «Microbiology and immunology» (Kyiv, 2018),

“Youth and modern problems of microbiology and virology” conference materials of the young scientists conference (Kyiv, 2019).

Структура та обсяг роботи. Текст дисертаційної роботи викладений на 132 сторінках основного тексту і сформований з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел. Робота містить 39 таблиць, 17 рисунків. Бібліографічний список налічує 411 джерел, з них 275 латиницею.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертаційна робота виконана в межах наукових досліджень, які проводять в лабораторії пробіотиків ІСМАВ НААН відповідно до планів завдання 05.00.03.03.Ф Дослідити синтез біологічно активних речовин пробіотичними штамами мікроорганізмів за впливу індукторів різної природи (ПНД 05 "Сільськогосподарська мікробіологія") та 07.00.05.02.П. Селекціонувати штами мікроорганізмів з високим пробіотичним потенціалом. Створити ефективний біопрепарат для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань (ПНД 07 "Сільськогосподарська мікробіологія").

РОЗДІЛ 1. ЗНАЧЕННЯ КИШКОВОЇ МІКРОБІОТИ, ПОРУШЕННЯ ЇЇ БАЛАНСУ ТА СПОСОБИ ВІДНОВЛЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Роль та склад кишкової мікробіоти кролів

Термін «мікробіота» використовується для позначення популяції мікроорганізмів, які заселяють різні топологічні зони макроорганізму, в тому числі й шлунково-кишковий канал (ШКК) [169]. Мікробіота макроорганізму складається із сукупності мікробіоценозів – мікробних спільнот, життєдіяльність яких тісно пов’язана зі функціонуванням організму хазяїна [179, 234]. Мікробіоценози формуються в природних біотопах, що контактують із зовнішнім середовищем (травна, сечостатева система, легені, шкіра та інші). У них розрізняють характерну для даного виду (облігатну, резидентну) і випадкову (факультативну, транзиторну) мікробіоту. Разом вони утворюють нормальну мікробіоту. Нормальна мікробіота – це відкритий біоценоз мікроорганізмів, що зустрічаються у здорових тварин і людей. Цей біоценоз властивий абсолютно здоровому організму і сприяє підтримці здорового статусу макроорганізму, правильному виконанню його нормальних фізіологічних функцій. Наприклад, відомо, що в кишечнику теплокровних тварин налічується близько 400 видів різних мікроорганізмів. Кількість мікробних клітин у 1 г калу досягає 10^{14} [104, 323, 403].

На сьогодні мікробіота макроорганізму розглядається як складна система, що виконує широкий спектр життєво-важливих функцій. У сучасній науковій літературі поширеною є думка про те, що в організмі людини та тварин не існує органу, біохімічного процесу чи функції, в яких би не брали участь, прямо чи опосередковано, симбіотичні мікроорганізми [120, 140, 161, 167, 337]. Значну увагу науковці приділяють питанням протиінфекційного захисту (колонізаційна резистентність), травній, біосинтетичній, імуномоделюючій, та детоксикаційній функціям кишкової мікробіоти [46, 68, 150, 187, 401].

Нормальне функціонування мікробіоти обумовлюється її кількісним та якісним складом. Формування і збереженість балансу мікробіоти макроорганізму є складним динамічним багатоступеневим процесом, в якому беруть участь фактори зовнішнього та внутрішнього середовища. Серед видового різноманіття у порівнянні з великою кількістю мікроорганізмів, які трапляються у кишківнику макроорганізму, кількість видів, для яких середовище кишківника є екологічним оптимумом, порівняно невелика [67, 167, 182, 224].

Варто зазначити, що кролики – тварини травоїдні та мають ряд особливостей травлення, що впливають на якісний та кількісний склад кишкової мікробіоти. Для кроликів характерне явище копрофагії. Травний канал цих тварин не в змозі з першого разу ефективно перетравити корм. При цьому високовисокомолекулярні речовини (геміцелюлоза) не всмоктується стінками кишечника при першому проходженні, такі поживні речовини стають доступними після тривалої обробки мікроорганізмами. У кролів добре розвинута сліпа кишка, яка за об’ємом у 7-8 разів більша від шлунку. Тому у цих тварин у сліпій кишці, окрім звичайного твердого калу, формуються особливого типу фекалії (більш м’які, світлі й більші), котрі тварини не виділяють, а ковтають прямо з анального отвору. Вони покриті оболонкою, що містить мікроорганізми, які перемішані з неперетравленими рослинними залишками, м’які фекалії піддаються у шлунку бродінню уподовж декількох годин. Процес копрофагії у кроликів сприяє активній інокуляції травного каналу кроленят мікроорганізмами-симбіонтами, а також формуванню та функціонуванню постійного співвідношення кишкових бактерій у дорослих особин [344]. Ще одна особливість полягає в тому, що шлунковий сік у кроликів виділяється постійно, оскільки шлунок практично не буває порожнім. Загальна кількість соку за добу складає 75–150 мл. Чистий сік із ізольованого шлунку данної частини має pH середовища 0,7–1,2, містить пепсиноген і хлористоводневу кислоту (0,20–0,35 %), в основному вільну. Величина pH змішаного вмісту шлунку коливається у межах 2,2–2,5 одиниці [318, 327, 328]. Зазначені особливості травлення кролів мають суттєвий вплив на склад кишкової

мікробіоти. Хоча склад кишкової мікробіоти часто вивчали у тварин та людей, на сьогодні в літературі відносно мало інформації щодо кролів.

Відомо, що заселення мікроорганізмами шлунково-кишкового каналу людей та тварин розпочинається відразу після народження. Спостереження Fortun-Lamothe та Boullier підтверджують, що спочатку мікроорганізми матері колонізують шлунково-кишковий канал новонароджених кроленят [105]. Доведено, що провідну роль будуть відігравати мікроорганізми, які перші заселяють кишківник і надалі здатні впливати на баланс кишкової мікробіоти вже у дорослого організму [115]. Критичним також буде період відлучення кроленят від кролематки. У цей час починається прийом твердої їжі і волокнистий субстрат потрапляє в сліпу кишку, починається колонізація мікроорганізмами, що бере участь у фіболізі (гідроліз целюлози, ксиланів, пектинів тощо). За даними Combes S. та ін. [206], у цей період (7–28 днів від народження) спостерігаються великі коливання балансу кишкової мікробіоти кроликів, що тривають до 3 тижнів після відлучення (49 діб від народження). Громова А. В. та ін. [304] встановили, що у період відлучення від матері мікробний пейзаж кроленят представлений *Bifidobacterium spp.* (10^9 КУО/г), *Lactobacterius spp*. ($2{,}55\times10^7$ КУО/г), *Enterococcus spp.* ($2{,}63\times10^7$ КУО/г), лактозонегативними (*Salmonella, Shigella, Proteus*) ($2{,}29\times10^5$ КУО/г) і лактозопозитивними (*Escherichia, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter*) ентеробактеріями ($2{,}19\times10^5$ КУО/г), *Staphylococcus spp.* ($2{,}26\times10^6$ КУО/г), *E. coli* гемолітичною ($5{,}47\times10^4$ КУО/г), *Candida spp.* (3,83×КУО/г). Остаточно баланс мікробіоти формується на час морфологічного та функціонального дозрівання органів кроликів, приблизно на 70 добу від народження [134, 149, 166, 206].

При мікробіологічних дослідженнях шлунково-кишкового каналу з'ясовано, що основна частина резидентної мікробіоти представлена такими групами бактерій: молочнокислі бактерії, біфідобактерії, ентерококи, бактероїди. При цьому найбільшу частку у моногастричних тварин різного віку складають представники родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* [16, 103, 108, 228]. Як показали дослідження Gouet P. [112] та Boulahrouf A. [34] бактерії є панівними

представниками мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролика у порівнянні з іншими мікроорганізмами (археї, гриби). Пізніше за допомогою молекулярних методів дослідження це було підтверджено іншими дослідниками [78, 188]. Також Bennegadi N. та ін. [78] повідомили про важливу групу археї, що складають 22 % та 12 % мікробіоти шлунково-кишкового каналу кроликів на 28 та 70 день життя відповідно. Упродовж перших 2 тижнів життя суворо анаеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми наявні у кількості 10^7-10^{10} КУО/г. Факультативні анаеробні бактерії, переважно *Streptoccus sp*. і *E. coli,* сягають максимального рівня на 2-му або 3-му тижні життя, а потім їх кількість знижується до залишкової після відлучення [105]. Відомо, що у складі мікробіоти шлунково-кишкового каналу гризунів та генетично близьких порядків ссавців, переважають представники типу *Bacteroides* [121]. Тому суворо анаеробні, неспороутворюючі бактерії, особливо грамнегативні бацили (*Bacteroides*), переважають у кожному сегменті кишківника кроликів. Це підтверджено дослідженнями й встановлено, що *Bacteroides* є найпоширенішим родом бактерій, що заселяють кишківник кролів [122, 221]. Ці бактерії виконують важливу роль у розщепленні рослинних полісахаридів [227] та в синтезі амінокислот [120], що обумовлює їх високу чисельність у травоїдних тварин. Варто зазначити, що *Bacteroides spp*. здатні проявляти різний ступінь патогенності до господаря, особливо *B. fragilis*, який є важливим умовно-патогенним збудником, що продукує ентеротоксин і викликає гостру діарею [24]. Дещо інші дані були отримані Jin D.X. [262] та Bäuerl C. [41] у своїх дослідженнях вони встановили, що домінантними бактеріальними групами в трьох відділах шлунково-кишкового каналу здорових кроликів є *Firmicutes* (72,12 %), *Bacteroidetes* (13,23 %), *Proteobacteria* (5,09 %), *Verrucomicrobia* (3,96 %) та *Actinobacteria*. Рябцева Е.В. та ін. [382] вказують, що у дорослих кролів, розвиваються переважно паличкоподібні форми бактерій, кількість яких становить 90,7 % від загального числа видів (з них грамнегативні - 70,8 %, грампозитивні - 29,2 %). За даними інших дослідників [303, 354, 389] встановлено, що переважають *Bacteroides* (в тому числі види *B. ruminicola* і

B. succinogenes), загальна чисельність яких становить 10^9-10^{10} КУО/г, *Peptococcus* і *Bifidobacterium* (*B. thermophilum* і *B. pseudolongum*). Значно меншою кількістю представлені бактерії кишкової групи - *E. coli* (близько 10^6 КУО/г), *Enterococcus faecalis* (до 10^7 КУО/г), *Lactobacillus* (*L. fermenti, L. acidophilus, L. brevis, L. salivarius*) (не більше ніж 10^7 КУО/г). Серед кишкової мікробіоти трапляються також *Megasphaera elsdenii, Clostridium butiricum* і представники роду *Methanogenes*. Невисокою є чисельність таких мікроорганізмів, як *Cl. perfringens, Cl. putrificum, Cl. sporogenes, Proteus vulgaris*. Серед целюлозолітичних видів, крім *Bacteroides succinogenes*, виявляються також *Butirivibrio fibrisolvens, Ruminococcus flavefaciens* і *R. albus*, що трапляються в травному каналі інших ссавців.

Кількість спороутворюючих бактерій (*Clostridium, Endosporus* і *Acuformis*) є незначною і належить до субдомінантної мікробіоти. Бактерії, що беруть участь у фібролізі (гідроліз целюлози, ксиланів, пектинів тощо), встановлюються лише після 15-денного віку, коли починається прийом твердої їжі, і волокнистий субстрат потрапляє в травну систему. З часом кількість фібролітичних мікроорганізмів повільно збільшується і становить 10^7 КУО/г у віці 25 діб [34]. Padilha M.T. та ін. встановили, що поки кроликів годують лише молоком, целюлозолітичні мікроорганізми не з’являються навіть у кроликів 35–42 добового віку [36].

На особливу увагу заслуговують дослідження, пов’язані з молочнокислими бактеріями. З літературних джерел відомо, що попередні дослідження рідко виявляли молочнокислі бактерії у відділах шлунково-кишкового каналу кролика [112, 245]. Однак на сьогодні встановлено, що молочнокислі бактерії постійно присутні у фекальних зразках кролика [59, 275]. Можна зробити припущення, що це пов’язано з місцем життя тварин, адже вітчизняні дослідники постійно виявляли молочнокислі бактерії у шлунково-кишковому каналі кролів [278, 304, 364]. У своїй роботі К. М. Мефед [354] зазначає, що максимальна кількість молочнокислих бактерій у клінічно здорових кролів виявляється у віці 45-48 діб. Згідно з дослідженнями Громової А.В. та ін. [304],

найбільше середнє значення *Lactobacillus* у зразках фекалій спостерігали в 55-добовому віці, коли чисельність зазначених мікроорганізмів підвищилася більш ніж у 3 рази – від 25,53±4,04 до 80,25±5,3 млн. КУО/г.

Мікробіота шлунково-кишкового каналу необхідна для повноцінної життєдіяльності макроорганізму, через те, що його онто- і філогенетичний розвиток відбувається в тісній взаємодії з біоценозом мікроорганізмів. За нормального фізіологічного стану взаємини макроорганізму і мікробіоти носять синергічний характер, і мікробіота при цьому виконує ряд дуже важливих функцій макроорганізму [310, 311, 366]. Біологічна роль мікробіоти шлунково-кишкового каналу полягає в підтримці гомеостазу, тобто стабільність внутрішнього середовища організму, його фізіологічних, біохімічних та інших процесів, що перебігають в організмі, у недопущенні проникнення патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів через слизову оболонку шлунково-кишкового каналу, створюючи тим самим бар'єр для розвитку ендогенних бактеріальних інфекцій.

Таким чином, аналіз літературних джерел показав науковий інтерес до мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів у період відлучення від матері й подальшій вікової зміни її кількісного і якісного складу.

Розбіжності даних про якісний та кількісний склад мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів, а також відсутність даних у літературі щодо впливу типу годівлі та його компонентів на кишковий мікробіом молодняку кролів спонукали нас провести дослідження з цього питання.

1.2. Поняття дисбактеріозу мікробіоти шлунково-кишкового каналу, його причини та наслідки

Термін «дисбактеріоз» має довгу історію, що починається з перших досліджень мікробіоти шлунково-кишкового каналу в кінці XIX-початку XX ст. і згадується A. Nissle ще у 1916 році [192]. У літературі не зустрічається однозначного визначення поняття. Наприклад V. C. Antharam та ін. у своїх роботах обмежують зміст поняття «дисбактеріоз» суттєвими змінами мікробіоти,

тобто дисбактеріоз характеризується помітним зменшенням біорізноманіття видів [148]. Велика кількість дослідників зазначають, що порушення балансу кишкової мікробіти вважатиметься дисбактеріозом за наявності негативного впливу на господаря. Дотримуючись цієї точки зору, Petersen C. та ін. роблять висновок, що "дисбактеріоз–це будь-яка зміна складу місцевих коменсальних мікробіоценозів щодо мікробіоценозів, характерних для здорового організму" [198]. Однак Levy M. та ін. стверджують, що простих порівнянь здорових та хворих організмів недостатньо, а необхідні ширші та глибші порівняння [69]. Деякі автори у своїх роботах виділяють три типи дисбактеріозу: збільшення кількості патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, зменшення кількості корисних бактерій та втрата різноманітності [69, 198]. Vangay P. та ін. виділяють чотири типи дисбактеріозу: втрата ключових таксонів мікроорганізмів, втрата різноманітності, зміна метаболічної активності та розвиток патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [20]. Holzapfel W. H. та ін. стверджують, що метаболічна активність може бути важливіша за фактичну кількість бактеріальних видів [196]. За даними А. В. Яшина, існує кілька загальновизнаних у ветеринарній практиці класифікацій дисбактеріозу кишківника. Так, за етіологією дисбактеріоз поділяється на тимчасовий–виникає у здорових особин у зв'язку зі зміною віку, сезону року, типу харчування тощо та постійний–викликаний функціональними порушеннями організму. За фазами розвитку, або за ступенем прояву, дисбактеріозу розрізняють I, II, III, IV ступені дисбіотичних порушень, для характеристики яких прийнятий ступінь порушення співвідношення кількості анаеробних і аеробних форм мікроорганізмів. За I та II ступеня зменшується кількість анаеробних мікроорганізмів, але вони ще переважають над аеробними. За III та IV ступеня анаеробна мікробіота кількісно дорівнює або є нижчою, ніж аеробна. Для всіх чотирьох фаз розвитку дисбактеріозу характерно зменшення кількості біфідо- і лактобактерій зі зниженням їх антагоністичної активності [411].

Важливо відзначити, що термін «дисбактеріоз» застосовується для пояснення причини або наслідку захворювань. Наприклад, "дисбаланс у складі

мікробіоти й зміна її функцій спричинене хворобою" [159] та "порушення балансу мікробіоти достатньо для виникнення захворювання" [135]. Дослідники посилаються на дисбактеріоз маючи на увазі два різних сценарії: один, коли дисбактеріоз обумовлений будь-якими причинами захворювання (або самим захворюванням), а другий, при якому дисбактеріоз сам по собі є головним причинним фактором виникнення захворювання. Якщо стається перший сценарій, дисбактеріоз–це діагностичний стан. Однак, якщо останній, у такому разі дисбактеріоз пояснює захворювання.

Вірогідно не встановлено причинно-наслідкові зв’язки. Тому актуальним залишається питання: дисбактеріоз викликає захворювання чи є його наслідком? Цю думку підтримують Bäckhed F. та ін. [60] і зазначають, що на сьогодні недостатньо доказів для класифікації дисбактеріозу як причини чи наслідку захворювання. Однак, попри непевну роль, яку дисбактеріоз відіграє при захворюванні, у літературі є вказівки, що його внесок у розвиток хвороби буває прямим, навіть якщо механізми залишаються невідомими [198].

Розглядаючи дисбактеріоз як причину захворювання, науковці виділяють основні чинники, що знижують колонізаційну резистентність слизової оболонки кишкової стінки й спричиняють порушення нормального балансу мікробіоти шлунково-кишкового каналу: фізичні (вологість, холод, тепло, іонізуюче випромінювання та ін.), хімічні (антигельмінтні препарати, антибіотики, антиметаболіти, циклофосфаміду та ін.), генетичні та імунологічні порушення, мікробні і вірусні інфекції, мікотоксини, дефіцит поживних речовин, вік. Серед основних факторів, що впливають на колонізаційну резистентність кишківника сільськогосподарських тварин, дослідники відзначають стрес, імунодефіцити, і антибіотикотерапію [309, 400, 395, 398].

Особливу небезпеку становить застосування препаратів широкого спектру дії–антибіотиків, що одночасно зі збудниками кишкових інфекцій пригнічують резидентну мікробіоту, яка в нормі виконує захисні функції та перешкоджає потенційним патогенним та умовно-патогенним мікроорганізмам колонізувати кишківник [341, 343]. Разом з тим, на сьогодні загально відомим є факт, що

антибіотикотерапія у ветеринарії та медицині призводить до утворення антибіотикорезистентності мікроорганізмів, у тому числі патогенних та умовно-патогенних [4, 66, 189, 197]. Захворювання, викликані стійкими до антибіотиків мікроорганізмами, дуже важко піддаються лікуванню.

Значний вплив на баланс мікробіоти шлунково-кишкового каналу здатні чинити різні токсико-хімічні фактори, що забруднюють навколишнє середовище, значна їх частка надходить з кормами. До них, в першу чергу належать пестициди, важкі метали, наночастинки та кормові добавки, що призводять до дисбактеріозів і пригнічують імунологічні функції організму [74, 229, 357]. Враховуючи вищезазначене, Jin Y. та ін. наголошують на важливості та необхідності розгляду мікробіоти кишківника як токсикологічного показника для забруднення навколишнього середовища [83].

У літературі продемонстровано істотний вплив кліматичних чинників на кишкову мікробіоту сільськогосподарських тварин [98, 168]. Так, О. Е. Корольовою [338] вивчено вплив стресу, викликаного холодом, і встановлено, що він призводить до надмірного розмноження умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів як в тонкому, так і товстому відділах кишківника з подальшим витісненням корисних мікроорганізмів. У результаті розвивається виражений ентероколіт шляхом пригнічення ферментативних реакцій, які беруть участь у пристінковому та порожнинному травленні.

Багатьма авторами доведено, що застосування антигельмінтних препаратів негативно впливає на мікробіоценоз шлунково-кишкового каналу тварин, знижаючи чисельність корисних мікроорганізмів і збільшуючи чисельність умовно-патогенних, тим самим сприяючи утворенню дисбактеріозу [70, 308, 399, 402].

Велика кількість досліджень продемонстрували, як раціон та дієта впливають на мікробіоту шлунково-кишкового каналу (табл. 1.1).

У зв’язку з виникненням дисбактеріозу, розвивається бактеріальна транслокація, яка визначається як проходження життєздатних умовно-патогенних мікроорганізмів через слизову оболонку шлунково-кишкового

каналу у внутрішні органи. Разом з бактеріями у внутрішнє середовище організму проникають ендотоксини, викликаючи ендогенну інтоксикацію, що приводить до самоотруєння організму токсичними продуктами метаболізму і тканинного розпаду. При цьому в рідинах і тканинах макроорганізму накопичуються проміжні та кінцеві продукти обміну речовин, які чинять токсичний вплив і викликають дисфункцію різних органів і систем [291].

Таблиця 1.1

Вплив раціону та дієти на баланс мікробіоти шлунково-кишкового каналу

Тип дієти	Мікроорганізми, на які впливає дієта		Посилання
	Група або вид	Чисельність	
З високим вмістом жиру	*Bifidobacteria* spp.	Зменшується (відсутні)	146
З високим вмістом жиру і цукру	*Clostridium inacuum*, *Catenibacterium mitsuokai* та *Enterococcus* spp.	Збільшується	258
	Bacteroides spp.	Зменшується	258
Знижений вміст вуглеводів	*Bacteroides* spp.	Збільшується	132
Обмеження калорійності	*Clostridium coccoides*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacteria* spp.	Зменшується	147
З високим вмістом складних вуглеводів	*Mycobacterium avium* підвид *paratuberculosis* та *Enterobacteriaceae*	Зменшується	132
	B. longum підвид *longum*, *B.breve* та *B. thetaiotaomicron*	Збільшується	202
З високим вмістом рафінованих цукрів	*C. difficile* та *C. perfringens*	Збільшується	26, 28
Вегетаріанська	*E. coli*	Зменшується	7
З високим вмістом тваринного молочного жиру	δ-*Proteobacteria*	Збільшується	65

Клінічна картина дисбактеріозу може проявлятися по-різному. Це залежить як від ступеня зміни мікробіоти, так і від організму (стан слизової оболонки

шлунку та кишківника, функції печінки, підшлункової залози, імунного статусу і т. д.). Дисбактеріоз у тварин проявляється, в першу чергу, порушеннями травлення. Відмічають зниження та відсутність апетиту, нудоту і блювоту, гнильний запах з рота, утворення зубного каменю, бурчання, біль у животі, а також сухість та лущення шкіри. Часто з'являються ерозії, алергічний дерматит. Фекалії кашкоподібні з неперетравленими грудочками їжі та слизом, рідкі та водянисті. У молодих тварин відзначають відставання в рості й розвитку (дефіцит маси тіла, гіпотрофія), часті захворювання [58, 269, 283].

У зв’язку з виникненням дисбактеріозу розвиваються виражені функціональні порушення в шлунково-кишковому каналі, знижується захисна здатність слизової оболонки кишківника. Це призводить до розвитку ендогенних бактеріальних інфекцій, у формі колібактеріозу, сальмонельозу, стафілококкозу, протейної інфекції та ін. Наприклад, у молодняку кроликів (у віці 7–14 тижнів) бактеріальний дисбактеріоз часто спричиняє мукоїдний ентерит, що призводить до анорексії, розвитку млявості та ураження сліпої кишки. Захворювання переважно виникає у тварин, що вирощуються у промислових умовах [123, 128]. Тяжкість залежить від віку кролика і серотипу збудника захворювання, хоча смертність може становити понад 50 % [92, 210].

Тому однією з актуальних проблем у тваринництві, в тому числі й кролівництві є дисбактеріози. Вони мають широке поширення і спричиняються багатьма факторами, завдають економічних збитків і можуть бути передумовами виникнення ендогенних бактеріальних інфекцій. Безконтрольне застосування антибактеріальних засобів для розв'язання даної проблеми призвело до виникнення антибіотикорезистентності патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. У зв’язку з цим, на сьогодні найбільш перспективним є використання пробіотичних препаратів.

1.3. Пробіотичні препарати та їх застосування в кролівництві

Використання антибіотиків у сільськогосподарському секторі значно перевищує медичне споживання. Кількість антибіотиків, що використовуються у світі в галузі тваринництва, оцінюється близько 63 000 тонн на рік [111, 130]. Це обумовлено тим, що одним з головних біологічних ризиків на підприємствах, що займаються тваринництвом, є чутливість поголів'я молодняку до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Упродовж тривалого часу антибіотики широко застосовувались для підвищення продуктивності тварин та профілактики захворювань шлунково-кишкового каналу. Однак тривале використання цих речовин призвело до розвитку стійких до антибіотиків штамів мікроорганізмів, що становлять загрозу для здоров’я тварин та людей і негативно впливають на навколишнє середовище [32, 265]. Наприклад, останні дані свідчать про те, що епізоотична ентеропатія кроликів, смертельна кишкова хвороба, яка спричиняє від 30 до 95 % смертності в період відлучення, пов'язана саме зі змінами в кишковій популяції бактерій, обумовленими використанням антибіотиків [41]. Виникнення мультирезистентних патогенних мікроорганізмів у наш час є однією з найбільших загроз для здоров’я населення в усьому світі [242].

За даними Kylie J. та ін. у кролівництві поширеність генів стійкості до антибіотиків у мікроорганізмів є мінливою і найчастіше (96 %) виявляється у бактеріальних ізолятах, виділених від кроликів, що були вирощені у промислових умовах [211].

Для усунення потенційних небезпек, 1 січня 2006 року в Євросоюзі було заборонено використання стимуляторів росту на основі антибіотиків регламентом (ЄС) № 1831/2003 [223]. Наслідком цього рішення стало інтенсивне впровадження пробіотиків у сільськогосподарському виробництві. Застосування пробіотиків дозволяє підвищити продуктивність і знизити захворюваність тварин.

Пробіотики–це живі штами мікроорганізмів, відібрані за чіткими критеріями, що при введенні у достатній кількості приносять користь для здоров’я господаря [233].

Основні вимоги до пробіотичних мікроорганізмів, окрім пов’язаних з корисними властивостями [107, 116, 186, 239, 400]:

1. Ідентифікація. Пробіотичні мікроорганізми необхідно ідентифікувати до виду.

2. Життєздатність. Пробіотичні мікроорганізми повинні бути життєздатними та мають накопичуватись у високій концентрації на поживних середовищах. Пробіотичний штам має проявляти стійкість до умов шлунково-кишкового каналу.

3. Біобезпека. Пробіотичний штам мікроорганізмів повинен бути безпечним щодо здоров'я тварин та людини.

4. Адгезія. Колонізація та розмноження у кишківнику є важливим критеріями відбору пробіотичної культури.

5. Кожен пробіотичний штам повинен бути специфічним для господаря, тобто він повинен колонізувати сумісного господаря.

У літературі описана велика кількість пробіотиків для тварин, які можна класифікувати наступним чином:

1. Бактеріальні та небактеріальні (на основі штамів дріжджів та грибів). Переважна більшість мікроорганізмів, що використовуються для виготовлення пробіотичних препаратів, є бактеріями [42]. Найчастіше це представники роду *Lactobacillus* [82, 252], *Bifidobacterium* [55, 77], *Bacillus* [9] та *Enterococcus* [259]. До небактеріальних пробіотиків відносяться препарати на основі грибів роду *Aspergillus* [178], *Candida* [145] та дріжджів *Saccharomyces* [85, 86].

2. Спорові та неспорові пробіотики. Спочатку у тваринництві використовувались лише пробіотики на основі мікроорганізмів, що не утворюють спори (*Lactobacillus* та *Bifidobacterium*), у наш час використовуються бактерії, що утворюють спори, наприклад, *Bacillus subtilis* [101],

B. amyloliquefaciens [79], *B. amyloliquefaciens* [76], *B. toyonensis* [2], *B. Coagulans* [80], *B. licheniformis, B. megaterium, B. mesentricus, B. polymyxa* [85].

3. Моноштамові та поліштамові (мультиштамові). Мікробний склад пробіотичних препаратів варіюється від одного штаму до двох і більше видів мікроорганізмів. Моноштамові пробіотики – це препарати на основі одного виду пробіотичного мікроорганізму. До цієї групи належать так звані класичні пробіотики–Лактобактерин, Біфідобактерин та ін. [10, 394]. Поліштамові пробіотики–виготовляються на основі двох та більше штамів мікроорганізмів. Наприклад: «Біфідо-лакто», «Лактобіфід», «Пробіон-Форте», «Субалін», «Ветом» та ін. [45, 392, 394]. Переважна більшість пробіотиків є саме поліштамовими, хоча переваги використання в одному препараті більше одного штаму або виду мікроорганізмів не були чітко встановлені [81].

4. Самоелімінуючі (allochthonous), на основі мікроорганізмів, яких зазвичай немає у шлунково-кишковому каналі тварин (наприклад, дріжджі). Пробіотичні препарати на основі представників облігатної мікробіоти (autochthonous) шлунково-кишкового каналу (наприклад, лактобактерії та біфідобактерії) не здатні самостійно елімінуватися з організму.

У літературі описано різні механізми дії пробіотиків, але більшість з них є гіпотетичними. Позитивний ефект пробіотиків полягає в пригніченні росту шкідливих бактерій шляхом зниження pH кишківника [176]. При цьому пробіотик діє як біорегулятор мікробіоти кишківника і підсилює природні захисні сили господаря [117]. Пробіотики збільшують чисельність корисних мікроорганізмів, які пригнічують ріст шкідливих мікроорганізмів, виробляючи інгібуючі речовини (бактеріоцини або органічні кислоти) та шляхом конкурентного виключення. Shehata A. S. та Tawfeek M. I відмічають такі механізми дії пробіотиків у кроликів: нейтралізація токсинів, стимулювання вироблення ферментів господарем, виробництво вітамінів та антимікробних речовин, конкуренцію за адгезію до епітеліальних клітин, підвищення стійкості до колонізації, стимуляцію імунної системи господаря та зменшення стресу [244]. Відомо, що пробіотичні бактерії знижують частоту транслокації

патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [95] та запобігають їх росту в кишковому каналі новонароджених кроликів [93, 127].

Дослідники виявили позитивний вплив пробіотиків на травлення та більш ефективне використання корму у кроликів [73, 91]. У літературі широко описані приклади значного підвищення кінцевої маси тіла кроликів внаслідок додавання пробіотиків до концентратного типу годівлі [15, 88]. Matusevicius P. та ін. встановили, що при згодовувані комбікорму з додаванням пробіотику, кролики були важчі на 310 г або 18 % [75]. Shrivastava A. K. та ін. зазначають, що вплив пробіотику на масу тіла у кроликів виявився незначним, хоча кролики дослідної групи мали більшу масу тіла (60 г), ніж кролики контрольної групи [84]. El-Sagheer M. та Hassanein H. H. M. повідомили, що дієта кроликів при доповненні пробіотиками приводить до збільшення маси тіла та покращення якісних показників м'яса [89]. Lam P. T. та Jamikom U. зазначили, що середньодобовий приріст маси тіла у кроликів збільшився з 24,0 г/добу в контрольній групі до 28,1 та 27,9 г/добу в дослідних групах, яким вводили *L. acidophilus* та *L. acidophilus* разом з *B. subtilis* відповідно [165]. Загалом велика кількість дослідників відмічає позитивний вплив пробіотиків на засвоюваність поживних речовин корму саме відлучених кроликів [8, 13, 14, 89, 114, 154, 193, 256, 286].

M. Z. El-Dimerdash та ін. продемонстрували, що додавання пробіотиків до питної води знижує захворюваність з 49 % до 14 % [251]. Thanh L. P. та Jamikorn U. встановили, що пробіотики на основі бактерій роду *Lactobacillus* виявились більш ефективними при профілактиці захворювань у кроликів, порівнюючи з пробіотиками на основі бактерій роду *Bacillus* [256]. K. H. Amber та ін. також спостерігали, що у молодняку кроликів при додаванні пробіотиків знижувалася смертність [73].

Ewuola E. O. та ін. вивчали вплив біологічно активних добавок, в тому числі пробіотиків на продуктивність відлучених кроликів. Вони відзначили, що характеристики туші дослідних тварин істотно не відрізняються від харктеристик контрольної групи [96]. Однак доступні літературні дані здебільшого стверджують протилежне. Востроілов О. В. та ін. встановили, що

застосування пробіотичного препарату здійснює позитивний вплив на м'ясну продуктивність, підвищення біологічної цінності м'яса кроликів, а також позитивно впливає на структурну організацію шлунка і печінки [297]. Измайлова Н. А. у своїх дослідженнях стверджує, що згодовування пробіотика кроленятам сприяло збереженню тварин, додатковому приросту живої маси і збільшення забійного виходу [321]. Пучніним А. М. зі співавторами було показано, що використання пробіотика сприяло середньодобовому приросту живої маси молодняку кроликів [375]. Литкіна Л. І. та ін. повідомляють, що за використання пробіотиків досягається 100 % збереженість поголів'я, збільшується забійний вихід на 4,51 % і рівень рентабельності на 12 % [296].

Узагальнюючи літературні дані можна зробити висновок, що загалом пробіотичні препарати є перспективною альтернативою антибіотикам під час вирощування кролів. Однак більшість даних отримані за використання пробіотиків на основі спорових культур та дріжджів, або взагалі бактерій невідомого джерела виділення. Істотна розбіжність в ефективності пробіотиків підтверджує, що мікроорганізми характеризуються різним ступенем прояву пробіотичних властивостей. Це спонукає до пошуку нових пробіотичних штамів мікроорганізмів, перспективних для створення пробіотичного препарату для кроликів на основі представників облігатної мікробіоти саме цих тварин.

1.4. Біологічні властивості молочнокислих бактерій як потенційних мікроорганізмів для пробіотичних препаратів

Молочнокислі бактерії широко застосовуються у промисловості, приклади наведено в таблиці 1.2. Одним з найважливіших напрямків використання є виробництво пробіотичних препаратів [281, 285, 289, 361, 386, 388]. Біоагенти цих препаратів найчастіше належать до роду *Lactobacillus*, а саме: *L. acidophilus, L. rhamnosus, L. reuteri, L. casei, L. plantarum, L. bulgaricus, L. delbrueckii, L. helveticus* [175, 260]. МКБ – це група грампозитивних кислотостійких, не утворюючих спори та цитохроми, каталазонегативних бактерій, що

характеризуються спільними метаболічними і фізіологічними характеристиками. Головним кінцевим продуктом метаболізму МКБ є D-і L-молочна кислота [255].

МКБ населяють різноманітні екологічні ніші навколишнього середовища, зокрема, рослини, молочні продукти, вино, а також вони є природними мешканцями слизових поверхонь ссавців, таких як шлунково-кишковий канал, піхва та ін. [17, 38, 50-52, 94, 129, 163, 184, 191, 199, 212, 218, 219, 257, 271, 332, 346]. Відомо, що ця група бактерій має здатність, яка не властива більшості інших мікроорганізмів, вони можуть використовувати для живлення молочний цукор (лактозу). Деякі вчені припускають, що ця здатність є пристосуванням до середовища, характерним для мікробіоти ШКК ссавців [106, 118].

Таблиця 1.2

Види бактерій роду *Lactobacillus*, що використовуються у промисловості та їх типові екологічні ніші

Види	Типові екологічні ніші	Типове промислове використання
L. acidophilus	ШКК, молочні продукти [257]	Пробіотики [257]
L. brevis	Квашені овочі, ШКК [50]	Закваски [184]
L. buchneri	Квашені овочі, молочні продукти, ШКК [129]	Закваски для силосу [219]
L. casei/paracasei	Молочні продукти, ШКК [264]	Виробництво сиру, пробіотики [247]
L. delbrueckii subsp.bulgaricus та *lactis*	Молочні продукти [164]	Виробництво кисломолочних напоїв та сиру [164]
L. helveticus	Молочні продукти [212]	Виробництво сиру [212]
L. plantarum	Квашена їжа та корми, ШКК [199]	Виробництво сиру, ковбаси, квашення овочів та силосу, пробіотики [199]
L. reuteri	ШКК, слизові оболонки шкіри [191]	Пробіотики [191]
L. rhamnosus	Молочні продукти, ШКК [264]	Пробіотики [38]
L. sakei	М'ясо, овочі [51, 99]	Ферментування ковбасних виробів[51]
L. salivarius	ШКК [52]	Пробіотики [52]

Представники МКБ є непатогенними для теплокровних тварин і людини та зазвичай мають статус generally recognized as safe (GRAS). Ретельна ідентифікація МКБ, які методами аналітичної селекції відбирають для виготовлення пробіотичних препаратів, є запорукою безпеки їх використання [63, 153, 266, 302, 392].

Відомо, що до ця група бактерій представлена родами *Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus and Weissella* [6, 109]. Характерні види МКБ належать до родів *Streptococcus*, *Lactobacillus* і *Leuconostoc*. Бактерії роду *Lactobacillus*–велика частина МКБ, рід грампозитивних, каталазонегативних, факультативно анаеробних бактерій паличкоподібної форми (поодинокі або в коротких ланцюгах), що на сьогодні налічує найбільше видів серед бактерій (більше 237 видів і 29 підвидів) [109, 255].

Початкова класифікація бактерій роду *Lactobacillus* ґрунтується на температурі росту та типу зброджування гексоз [195]. Більш сучасна класифікація, запропонована Hammes W. P. розподіляє бактерії цього роду на облігатні гомоферментативні, факультативно гетероферментативні та облігатно гетероферментативні на підставі типу зброджування цукрів і набору метаболітів [30, 125]. Однак з появою інформації про види роду *Lactobacillus*, що не входять у жодну з метаболічних груп [125], стало зрозуміло, що класифікація на основі особливостей метаболізму є недостатньою.

Collins M. D. та ін. виконали перший філогенетичний аналіз роду, використовуючи метод секвенування гена 16S рРНК. Види, описані ними, були розділені на три філогенетичних кластери: група *Lactobacillus delbrueckii*, група *Lactobacillus casei-Pediococcus* (пізніше розділена на чотири підгрупи) і група *Leuconostoc* [200, 204]. Опис великої кількості нових видів упродовж останніх десятиліть, приводив до неодноразового перегляду структури роду *Lactobacillus* і формування більшого числа різних філогенетичних груп. Так, група *Lactobacillus delbrueckii* в 1995 р була перейменована в групу *Lactobacillus acidophilus* [125]. Проте у 2003 знову отримала свою колишню назву у зв'язку з

тим, що типовим видом групи є вид *L. delbrueckii* [126]. Група *Lactobacillus casei* була розділена на більш дрібні групи, а групи *Pediococcus* і *Leuconostoc* виділені в самостійні роди. Слід також зауважити, що деякі види бактерій роду *Lactobacillus* міняли своє таксономічне положення, переміщаючись з однієї групи в іншу [61, 100, 126, 232]. Всупереч тому, що дослідження послідовності гена 16S рРНК здійснило істотний внесок у розвиток більш точної класифікації, кореляція між традиційною класифікацією і філогенетичною спорідненістю є незначною [30, 100].

Останнім часом E. Salvetti та ін. [53] досліджуючи спорідненість 269 видів, що належать до родин *Lactobacillaceae* (*Lactobacillus* та *Pediococcus*) та *Leuconostocaceae* (*Convivina, Fructobacillus, Leuconostoc, Oenococcus* і *Weissella*), а також референтні штами з родів *Atopobium, Carnobacterium, Kandleria* та *Olsenella*, встановили, що ці роди філогенетично переплетені, а рід *Lactobacillus,* зокрема, є дуже неоднорідним. Аналогічні результати отримані Sun Z. та ін. [97], вони показали, що середня нуклеотидна ідентичність для видів роду *Lactobacillus* настільки ж низька, як значення на таксономічному рівні порядку. Тому автори дійшли висновку, що формальне розщеплення роду неминуче і запропонували 10 потенційних груп мікроорганізмів, які можуть стати основою для перекласифікації. В іншому дослідженні, що охоплює майже всі наявні послідовності геномів *Lactobacillus*, Parks та ін. дискримінували 16 груп у межах роду [5]. Wittouck S. та ін. на основі порівняння видів, запропонували дев'ять об’єднань двох та більше видів і один поділ виду. Крім того, виявили, вісім не названих видів, які не були описані раніше [3].

На сьогодні, спираючись на філогенетичний аналіз геному виявлено, що роди *Fructobacillus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus* і *Weissella* походять від предка *Lactobacillus* і становлять внутрішні гілки таксону *Lactobacillus,* тому для їх об’єднання було запропоновано позначення "Lactobacillus genus complex" (LGC) [3]. Систематика МКБ дуже складна і постійно змінюється. Це обумовлено широким промисловим використанням цих бактерій. Вчені

припускають, що скоріше за все, найближчим часом рід *Lactobacillus* буде розділено [207].

Варто зазначити, що пробіотичні властивості зазвичай притаманні не виду, а конкретному штаму [260]. Тому ефективність пробіотичних препаратів безпосередньо обумовлена біологічними особливостями мікроорганізмів, які є основою цих препаратів. Наприклад, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 проявляє виражену антагоністичну активність, регуляцію імунної відповіді, а також зменшує запалення кишківника [47, 138, 217]; *Lactobacillus casei* Shirota здійснює сприятливий вплив на метаболізм товстої кишки та полегшує симптоми непереносимості лактози [27, 254]. Враховуючи вищезазначене, великий інтерес представляє дослідження штамів одного виду, виділених з різних еконіш.

Однією з важливих особливостей МКБ є їх антагоністична активність щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, на сьогодні описана в літературі досить широко [11, 18, 102, 152, 153, 236, 240, 241, 267, 292, 305, 322, 326, 360]. Відомо, що антагоністична дія досягається шляхом конкурентного виключення та/або продукування бактеріоцинів і органічних кислот, регулюючи таким чином баланс мікробіоти ШКК [185, 260]. Основними низькомолекулярними антимікробними метаболітами МКБ є органічні кислоти (насамперед, молочна та оцтова), гідроген пероксид, диацетил, реутерін, піролідин-5-карбонова кислота; високомолекулярними–бактеріоцини [35, 39, 48, 124, 174, 249]. Здатність МКБ до синтезу антимікробних метаболітів обумовлює спектр та інтенсивність антимікробного впливу. Варто зазначити, що ступінь атимікробної активністі є специфічним для штаму [208]. Тому актуальним є дослідження антагоністичної активності нових штамів МКБ.

Ефективність пробіотиків також залежить від здатності бактерій-пробіонтів до виживання та колонізації у ШКК макроорганізму. Це набуває особливого значення, коли не збігається джерело виділення пробіотичних мікроорганізмів та кінцевий споживач пробіотику.

Показано, що для потенційних пробіотичних штамів важливим критерієм є толерантність до умов ШКК, а значення pH 3,0 вважається стандартним [44, 213, 230, 333]. Ці показники обумовлюють кількість життєздатних бактерій, що потрапляють до кишківника. M. A. Ehrmann та ін. [43] продемонстрували, що бактерії роду *Lactobacillus,* як правило, витримують pH 3,0, однак рівень стійкості відрізняється серед ізолятів. У дослідженнях Jose N. M.[156] і Liu X. [238], МКБ виживали за pH 3 у той час як зниження життєздатності спостерігалося лише при pH 2. За даними Кігель Н. Ф., скринінг 85 промислових штамів показав, що 70 % від їх загальної кількості витримували певний час у живильному середовищі з pH 3, 31 % – резистентні до 4,5 % NaCl, 65 % – до 40 % жовчі [333]. Постає питання: чи поширюється дана закономірність на МКБ, виділених з кишківника кролів.

Окрім вищезазначених властивостей, важливу роль під час скринінгу потенційних штамів для створення пробіотичних препаратів відіграє здатність МКБ до адгезії [23]. Адгезія бактерій–складний процес, у якому залучені як специфічні (ліганд-рецепторні), так і неспецифічні (гідрофобні, електростатичні) взаємодії між мікробними клітинами та епітеліоцитами. Вченими встановлено, що адгезія включає взаємодію між молекулярними структурами (ліпотейхоєві кислоти, білок поверхневого шару, пептидоглікан), пов'язаними з бактеріями та їх рецепторами розпізнавання в епітеліальних клітинах господаря [40, 253, 261, 268]. Поверхневі білкові компоненти, що опосередковують адгезію бактерій до клітин епітелію кишківника, були продемонстровані для багатьох видів *Lactobacillus* [141, 225, 261]. Очевидно, адгезія МКБ є специфічною і залежить від рецепторів конкретного штаму та рецепторів клітин епітелію певного макроорганізму. Зважаючи на вищезазначене, для корекції кишкової мікробіоти тварин доцільно використовувати бактерії, виділені від тварин того ж виду.

Узагальнюючи літературні дані потенційний пробіотичний штам мікроорганізмів має відповідати наступним критеріям:

1. бути ідентифікованим до виду;

2. бути виділеним від того виду тварин, для якого він буде застосовуватися;

3. витримувати несприятливі умови ШКК;

4. бути здатним до адгезії та колонізації в ШКК;

5. продукувати антимікробними метаболіти та запобігати розвитку патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів;

6. мати чітко визначену і підтверджену дослідженнями позитивну дію на здоров’я макроорганізму.

Відсутність даних щодо зазначених вище критерій у доступній науковій літературі спонукала до дослідження біологічних властивостей бактерій роду *Lactobacillus,* що були виділені нами із ШКК кролів і є перспективними для створення пробіотичних препаратів.

1.5. Висновки щодо огляду літератури та обґрунтування напрямів досліджень

1. З літературних джерел відомо, що найбільш активно серед всіх біотопів макроорганізму, мікроорганізми заселяють шлунково-кишковий канал тварин. Характер взаємин мікроорганізмів з макроорганізмом може бути різним і залежить від особливостей його раціону. Нормальне функціонування мікробіоти обумовлюється її кількісним та якісним складом. У науковій літературу відсутні узгоджені дані стосовно нормального балансу мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів, що спонукало нас до дослідження цього питання.

2. Дисбактеріози є актуальною проблемою сучасного тваринництва, в тому числі й кролівництва. Порушення балансу кишкової мікробіоти може виникати у кроликів з багатьох причин. Особливо небезпечними вони є у період відлучення, в цей час спостерігається найвищий падіж від інфекційних захворювань.

3. Пробіотичні препарати є перспективною альтернативою антибіотикам для профілактики інфекційних захворювань і підвищення продуктивності тваринництва. У науковій літературі широко описані позитивні ефекти використання пробіотичних препаратів у тваринництві. Розбіжності даних в ефективності пробіотиків підтверджують, що мікроорганізми характеризуються різним ступенем прояву пробіотичних властивостей. Тому пошук нових перспективних штамів мікроорганізмів залишається актуальним завданням.

4. Біологічні властивості МКБ, які мають різні джерела походження, досить повно описані в сучасній науковій літературі. Дані щодо бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з ШКК кролів, практично відсутні. Це спонукало нас провести дане дослідження.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Мікробіологічні дослідження

Мікробіологічне дослідження вмісту дистального відділу шлунково-кишкового каналу тварин проводили на середовищах, елективних для різних груп мікроорганізмів, використовуючи метод десятикратних розведень. Для виділення молочнокислих бактерій використовували капустяний агар (за Є. І. Квасниковим) та середовище MRS (De Man, Rogosa, Sharpe medium) [329]. МКБ виділяли шляхом дослідження біологічної проби посліду, хімусу, вмісту та слизової оболонки сліпої кишки кролів. Із біологічних зразків готували суспензію з розрахунку 1 г на 9 $см^3$ фізіологічного розчину та висівали на стерильне знежирене молоко; біфідобактерії — на середовище Блаурокка; бактерії групи кишкової палички — на середовище Ендо; дріжджоподібні гриби — на середовище Сабуро з 0,1 г/л антибіотику ципрофлоксацину [29, 301, 329]. Спороутворюючі бактерії визначали шляхом висіву на м’ясо-пептонний агар після прогрівання розведень у фізіологічному розчині на водяній бані при 80 °С упродовж 20 хв. Посіви інкубували в термостаті за температури 37 °С упродовж 24-48 годин, дріжджоподібні гриби – за 28 °С протягом 72 годин [355].

Кількість бактерій розраховували за формулою:

$$X=Z\times 10^{n}/Y,$$

де:

X – кількість бактерій;

Z – кількість вирослих колоній;

10^{n} – розведення;

Y – посівна доза.

Визначення належності ізолятів до МКБ проводили за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками, а саме: фарбування за Грамом, форма та розміри клітин, рухливість, наявність каталази та дихальних систем, здатність перетворювати нітрати в нітрити [353]. Морфологію колоній,

що виросли на середовищі досліджували під бінокулярним мікроскопом Біолам Р-15(Росія). Морфологію клітин вивчали мікроскопією препаратів, забарвлених за Грамом. Крім того, для визначення належності паличкоподібних форм МКБ до роду *Lactobacillus* вивчали здатність рости за температури 15 °С та 45 °С, утворювати газ із глюкози, аміак з аргініну. Видову приналежність МКБ попередньо вивчали за спектром зброджування вуглеводів, використовуючи середовища Гісса з додаванням вуглеводів у кількості 2 % [280].

Молекулярно-генетичну ідентифікацію проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Синтезовані й ліофілізовані в НВФ „ЛИТЕХ” (Росія) олігонуклеотидні праймери (табл. 2.1) були розведені до концентрації 100 пкм/мкл “Ultra Pure Distilled Water” (Invitrogen, Cat.#10977-023, США) і зберігалися за температури (– 20) °С до використання. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на термоциклерах «Терцик» (ДНК-технологія, Росія) та «Т1» (Biometra, Німеччина).

Таблиця 2.1

Праймери, використані у дослідженні

Праймер	Вид мікро-організмів	Послідовність	Література
Aci I	*Lactobacillus acidophilus*	TCTAAGGAAGCGAAGGAT	Tilsala-Timisjärvi, A., & Alatossava, T. (1997)
Aci II	*Lactobacillus acidophilus*	CTCTTCTCGGTCGCTCTA	
PeCr	*Lactobacillus helveticus*	TTTGCCAGCATTAACAAGTCT	Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Parini, C., & Manachini, P. L. (2001)
PeCf	*Lactobacillus helveticus*	CTGTTTTCAATGTTGCAAGTC	

Реакцію проводили методом «гарячого» старту в об’ємі 0,025 см^3. З метою мінімізації утворення неспецифічних димерів праймер-матриця і їх ампліфікації, був використаний метод приготування реакційної суміші з фізичним розділенням компонентів ПЛР. Аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5 % гелі агарози (Sigma, США).

Розташування смуг ДНК на отриманій електрофореграмі та їх реєстрацію виконували за допомогою системи гель-документування “Molecular Image GelDoc XR+” (BioRad, США).

Визначення нуклеотидної послідовності ПЛР – фрагментів гену 16S рРНК. Бактеріальну ДНК для проведення ПЛР ампліфікації виділяли з культури бактерій за допомогою набору «ДНК-Сорб 100» (Росія) згідно інструкції виробника. Для постановки ПЛР використовували набір реактивів «АмплиСенс PCR» (Росія) та ампліфікатор «Терцик» (Росія). ПЛР-ампліфікації проводили в об'ємі 30 мкл. Склад реакційної сіміші: 50 мМ KCl; 10 мМ Трис-HCl pH 9(25 °C); 1,5 мМ $MgCl_2$; Тритон Х-100; 200 мкМ кожного дНТФ; 100 нг кожного праймеру, та 0,15 одиниць Taq-полімерази. В якості матриці використовували приблизно 100 нг геномної ДНК. ДНК гену 16S рРНК ампліфікували за допомогою універсальних праймерів рН та рА [62]. Умови реакції: початкова денатурація при 95 °C – 3 хв, 35 циклів: денатурація – 94 °C – 1 хв, відпал праймерів при 65 °C – 1 хв, елонгація при 72 °C – 2 хв. Продукти ампліфікації розділяли у 1,5 % агарозному гелі з вмістом бромистого етидію, за напруженості електричного поля 6 вольтів/см упродовж 30 хв та візуалізували в ультрафіолетовому світлі довжиною 315 нм. Електрофорез проводили в камері для горизонтального електрофорезу BioRad PowerPack Basic. ДНК з необхідного фрагмента виділяли з використанням спектрофотометра Nano Drop 1000 при довжині хвилі 260 нм.

Визначення нуклеотидної послідовності ПЛР – фрагментів проводили на генетичному аналізаторі ABI PRISM (Applied Biosystems) з використанням набору Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applide Biosysems, США), відповідно інструкції виробника. Побудову зворотного компліменту, редагування, вирівнювання та елаймент послідовностей здійснювали за допомогою Multalin та Sequence Manipulation Suite. Пошук гомологічних нуклнотидних послідовностей здійснювали за допомогою програми BLAST в базі даних GeneBank. Для побудови філогенетичного дерева використовували

метод «об'єднаних сусідів» Neighbor-Joining (NJ). Додатково в аналіз були включені нуклеотидні послідовності депонованих у міжнародних базах.

Молокозсідальну активність (МЗА) та інші технологічні показники визначали відповідно до загальноприйнятих методик [29]. Закономірності росту чистих культур вивчали, застосовуючи періодичне культивування на знежиреному молоці. Чисельність мікроорганізмів визначали за кількістю КУО на агаризованому живильному середовищі, використовуючи метод граничних десятикратних розведень [329]. Розрахунок параметрів росту культур здійснювали на підставі кривих росту мікроорганізмів в координатах lg КУО — тривалість культивування [329]. Для вивчення динаміки зростання упродовж 48 годин проводився відбір проб. Кожні 6 год визначалося число КУО. Кожні 2 години визначалася біомаса та кінетичні параметри росту культур: швидкість експоненціального зростання (μ, годину-1), константа швидкості ділення (V, час-1), час генерації (g, годину).

$$\mu = 1/x \times dx/dt,$$

де:

μ – питома швидкість експоненціального зростання;

dx – зміна біомаси x за проміжок часу dt.

$$V = lgN\text{-}lgN_0/lg2\ (t\text{-}t_0),$$

де:

V – константа швидкості ділення, N і N_0 - кількість клітин в момент часу t і t_0 логарифмічною фази росту культури.

$$g = 1/V,$$

де:

g – час генерації;

V – константа швидкості ділення.

Кількість кислоти, утвореної досліджуваними бактеріями, визначали титруванням. МКБ культивували упродовж 14 діб на стерильному знежиреному молоці, після чого культуральну рідину об'ємом 5 $см^3$ з додаванням спиртового розчину фенолфталеїну титрували 0,1 Н розчином NaOH до утворення стійкого

забарвлення малинового кольору. Кислотність виражали в градусах Тернера (°Т). 1°Т відповідає 1 мл розчину NaOH, який витратили на титрування 100 мл дослідної проби. 1°Т = 0,009 г кислоти [329].

Дослідження антагоністичної активності проводили *in vitro* дифузним методом блоків [315]. Тест-культурами були 8 штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів: *Proteus mirabilis* № 3177, *Proteus vulgaris* № 13, *Staphylococcus aureus* № 906, *Salmonella typhimurium* № 89, *Shigella flexneri* 2a № 160, *Klebsiella pneumoniae* № 67, *Escherichia coli* 055K59 № 3912, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853. Штами умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів отримано з Чернігівської обласної санітарно-епідеміологічної станції. Використаний у роботі штам *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko* одержано з колекції штамів мікроорганізмів лабораторії пробіотиків ІСМАВ НААН.

Патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми культивували на м’ясо-пептонному агарі (МПА) за температури 37 °С упродовж 24 год.

Для дослідження адгезивних властивостей бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового каналу кроликів, використовували метод, який базується на різниці оптичної щільності (ОЩ) [380]. Експерименти проводили зі суспензіями бактерій, що відповідали 1,0 од. ОЩ за довжини хвилі світла 540 нм. Субстратом адгезії були еритроцити людини II (А) Rh-групи крові, а також лабораторних (миші, кролика) та сільськогосподарських тварин (свині, великої рогатої худоби). Кров людини отримали з Чернігівської станції переливання крові. Як антикоагулянти крові використовували 3,8 % розчин лимоннокислого натрію (1:10). Еритроцити тричі відмивали десятикратним об’ємом 0,9 % розчину хлориду натрію з подальшим центрифугуванням за 1000 об./хв упродовж 5 хв і ресуспензували в тому самому розчині. Кінцева концентрація еритроцитів у суспензії становила $1{,}0\times10^{12}$ кл/л.

Під час проведення експерименту змішували у пробірках 1,0 мл суспензії еритроцитів і 2,5 мл суспензії бактерій. Як контроль використовували проби, що містили: 2,5 мл суспензії бактерій та 1,0 мл 0,9 % розчину натрію хлориду;

1,0 мл суспензії еритроцитів і 2,5 мл 0,9 % розчину натрію хлориду. Зразки інкубували на платформі, що обертається, за 37 °С упродовж 30 хв, після чого еритроцити осаджували центрифугуванням 1000 об./хв упродовж 1,5 хв. Потім зі зразків відбирали надосадову рідину об'ємом 2,0 мл та на фотоелектроколориметрі КФК-2 визначали величину її ОЩ.

Фіксуючу активність еритроцитів до бактеріальної суспензії досліджуваних штамів розраховували за формулою:

$$ПА=(Дк1+Дк2-ДдЗ)/Дк1\times100\%,$$

де:

ПА – показник адгезії;

Дк1 – ОЩ надосадової рідини в першому контрольному зразку;

Дк2 – ОЩ надосадової рідини в другому контрольному зразку;

ДдЗ – ОЩ надосадової рідини в дослідному зразку.

З метою визначення граничних значень pH для росту МКБ, досліджувані бактерії культивували на середовищі MRS з 0,15 % агару. Значення pH встановлювали 10 % розчином оцтової кислоти (CH_3COOH) та 10 % розчином натрію гідрооксиду (NaOH). У пробірки, що містили 9 мл напіврідкого середовища MRS з заданим значенням pH середовища від 2 до 11 або концентрацією NaCl (1–6 %), HCl (1–4 %), жовчі (20, 40 %) та фенолу (0,5 %), вносили 1 мл суспензії бактерій, що містила 1×10^6 КУО/мл та культивували за температури 37±2 °С упродовж 48 год, у зв'язку з особливостями умов травлення кролів.

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) антибіотика проводили на рідкому середовищі MRS з додаванням антибіотиків (ампіцилін, бензилпніцилін, еритроміцин, тетрациклін, стрептоміцин), фіксуючи пробірки, у яких повністю відсутній ріст досліджуваних штамів. Посіви інкубували упродовж 48 год за температури 37±2 °С. Диско-дифузійним методом визначали чутливість до антибіотиків у MRS-агарі з використанням стандартних паперових дисків, які просочені антибіотиками [316]. Інтерпретацію результатів тестування проведено відповідно до літературних джерел [19]. Результати чутливості до

антимікробних препаратів оцінювали за діаметрами зон затримки росту досліджуваних штамів, згідно з рекомендаціями виробника дисків. Доводили густину бактеріальної суспензії до показника 1 за McFarland Standard, підготовлені таким чином суспензії досліджуваних ізолятів у кількості 0,1 $см^3$ рівномірно розподіляли стерильним шпателем на поверхні живильного середовища (MRS). Через 20-30 хв після посіву на середовище додавали диски з антибіотиками. Чашки інкубували в анаеробних умовах упродовж 48 год за температури 37±2 °С.

2.2. Дослідження на тваринах

Для дослідження складу кишкової мікробіоти молодняку кролів за різних типів годівлі було закладено дослід 1: тварин, починаючи з 24-го по 94-й день життя, розділяли на дві групи, по 6 кролів у кожній. Кролів 1-ї дослідної групи годували за концентратним типом годівлі: комбікорм Agrovetkorm (Україна), який складав 100 % раціону; 2-ї групи — за комбінованим типом годівлі (за П. Курляком) [342]: зерно складало 11 %, соковиті корми — 12 %, зелена маса — 70 %, грубі корми — 7 %.

Для дослідження впливу компонентів дієти на склад мікробіоти шлунково-кишкового тракту молодняку кролів проводили дослід 2: тварин, починаючи з 24-го по 94-й день життя, розділяли на три групи, по 6 кролів у кожній. Кролям 1-ї дослідної групи згодовували переважно зелену масу лучних трав (90 %), решту складали зерно, сіно, коренеплоди; 2-ї — сіно лучних трав (90 %), решта — зелена маса, зерно, коренеплоди; 3-ї — зерно пшениці та вівса (90 %), решта — зелена маса, сіно, коренеплоди [374].

Безпечність МКБ вивчали на лабораторних тваринах [340, 358]. Дослідження проводили на моделі білих статевозрілих безпородних мишах вагою 18-20 г. Групи тварин формували (по 6 у кожній) за методом рандомізації з попередньою акліматизацією 15 діб до умов утримання. Мишей з помітними ознаками незадовільного стану здоров’я виводили з експерименту. Для

отримання суспензії активних клітин досліджувані бактерії культивували при температурі 37±2 °С продовж 48 год на рідкому середовищі MRS. Клітини відділяли від середовища центрифугуванням при 3000 об/хв упродовж 15 хв. На стерильному фізіологічному розчині готували суспензію клітин. Концентрацію клітин визначали за McFarland Standard, потім вводили перорально тварині у концентрації $\geq 36{,}0\times10^9$ кл/мишу та внутрішньочеревно у концентрації $\geq 2{,}0\times10^9$ кл/мишу. Контрольним групам вводили стерильний фізіологічний розчин. Критерієм авірулентності штаму слугували відсутність симптомів захворювання та загибелі тварин. Нагляд за тваринами проводили щоденно протягом 15 діб після введення суспензії, після чого, встановлювали інвазивність штаму за здатністю клітин проникати всередину тканин органів тварин та здатність розвиватися у них після перорального зараження. Через 15 діб після зараження виводили мишей з експерименту, проводили макроскопічні дослідження внутрішніх органів тварин, висіви зразків тварин на живильне середовище MRS-агар для виявлення ретрокультур [340, 358].

Дослідження можливості використання бактерій роду *Lactobacillus* для профілактики сальмонельозних інфекцій проводили у дослідах *in vivo* на білих лабораторних мишах вагою 10–14 г. Для дослідження впливу введення молочнокислих бактерій перед інфікуванням збудниками сальмонельозу тварин розділяли на три контрольні та дві дослідні групи по 10 голів у кожній. Перша група залишалася інтактною, тваринам цієї групи згодовували впродовж усього експерименту лише звичайний раціон. Тварини другої та третьої контрольних груп отримували звичайний раціон, а на восьму добу досліду їм вводили *per os* суспензії, що містили штами *Salmonella typhimurium* № 89 та *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko,* відповідно. Кожна доза становила $2{,}5\times10^6$ КУО бактерій. Тваринам четвертої та п’ятої дослідних груп упродовж тижня, окрім звичайного раціону, *per os* вводили ферментоване досліджуваним штамом знежирене молоко в дозі, що містила 1×10^8 КУО бактерій. На восьму добу експерименту тваринам дослідних груп вводили до раціону суспензії, що містили *Salmonella typhimurium* № 89 (четвертій групі тварин) та *Salmonella*

enteritidis Ч1 *var. Issatschenko* (п'ятій групі тварин) у тих самих дозах, що й тваринам другої та третьої контрольних груп. За станом здоров'я мишей стежили упродовж 15-ти діб після введення бактерій роду *Salmonella.*

Також вивчався ефект МКБ після введення збудників сальмонельозних інфекцій лабораторним тваринам. Тварин розділяли на три контрольні та дві дослідні групи по 10 голів у кожній. Перша група залишалася інтактною, тваринам цієї групи згодовували упродовж усього експерименту лише звичайний раціон. Тваринам другої та третьої контрольних груп вводили *per os* суспензії, що містили *Salmonella typhimurium* № 89 та *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko,* відповідно. Кожна доза містила 1×10^9 КУО бактерій. Тваринам дослідних груп було введено суспензії, що містили *Salmonella typhimurium* № 89 (четвертій групі тварин) і *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko* (п'ятій групі тварин) у тих самих дозах, що й тваринам другої та третьої контрольних груп. Тваринам четвертої та п'ятої дослідних груп через 20 хв після введення суспензій, що містили бактерії роду *Salmonella* упродовж 15 діб, окрім звичайного раціону, *per os* задавали ферментоване досліджуваним штамом знежирене молоко, у дозі, що містила 1×10^8 КУО. За станом здоров'я мишей стежили впродовж 15-ти діб.

Під час проведення досліджень із тваринами поводились відповідно до загальних етичних вимог щодо використання хребетних тварин у медичних і біологічних експериментах [379], на підставі рішення засідання комісії з питань етики та біоетики Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (протокол №1 від 21 липня 2015 року).

Відновлення та корекція балансу мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків, за використання МКБ проводили на безпородних здорових кролях віком 28 діб, що харчувалися за комбінованим типом годівлі у віварії лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України (ІСМАВ НААН). Перед початком проведення експерименту відбирали

проби вмісту товстого кишківника для дослідження видового та кількісного складу мікробіоти ШКК молодняку кролів.

Тварин розділено на три контрольні та п’ять дослідних груп тварин , по 8 голів у кожній. Перша контрольна група тварин залишалась інтактною упродовж всього експерименту. Решта кролів отримували препарат «Трисульфонвет» (Україна) для моделювання у тварин штучного дисбактеріозу кишківника [377]. Добова доза складала 100 мл препарату на 100 л питної води упродовж 5 діб, відповідно до інструкції. По завершенню курсу у тварин фіксували дисбактеріоз мікробіологічними дослідженнями. Після антибіотикотерапії тварини другої контрольної групи отримували ферментно-пробіотичну кормову добавку «Імунобактерин-D» (Україна), до складу якої входять бактерії: *Bacillus subtilis, B. licheniformis*, а тварини третьої контрольної групи отримували лише звичайний раціон.

Тваринам четвертої групи до питної води додавали суспензію МКБ, культивованих на гідролізованому молоці в розрахунку 1 мл/л, тваринам п’ятої групи – 5 мл/л, тваринам шостої групи – 10 мл/л, тваринам сьомої групи – 50 мл/л, тваринам восьмої групи – 100 мл/л. Титр бактерій становив 1×10^9 КУО/мл.

Експеримент тривав 14 діб. Проби відбирали на першу, третю, сьому та чотирнадцяту добу експерименту. Видовий та кількісний склад мікробіоти ШКК молодняку кролів визначали шляхом висівання проб вмісту товстого кишківника на селективні живильні середовища.

Оцінку ефективності МКБ при відгодівлі кролів досліджували на кролефермі ПП «ВИМАЛАГРО». У дослідженні використовували новозеландських білих молодих кроликів. Тварини були розділені дві групи: контрольна група (n = 32) та експериментальна група (n = 34). Кожна клітка для відгодівлі була розділена на 4 відділення по 2 кролі у кожному. Всі 8 кролів клітки мали центральну загальну годівницю. Клітки розміщували у закритій будівлі під контрольованим та постійним мікросередовищем. Стандартний денний і нічний годинний діапазон 16L: 8D забезпечувався за допомогою

штучного освітлення, тоді як температура підтримувалася між 18 і 23 °С. Тваринам обох груп згодовували комбікорм ПК90 ЛЮКС молодняк кролів від 30 днів до забою (Україна). Тваринам дослідної групи до питної води додавали суспензію МКБ, культивованих на гідролізованому молоці в розрахунку 50 мл/л. Експеримент починався від відлучення (35 днів) і закінчувався через 84 дні. Під час спостереження фіксувалися такі показники: маса тіла при відлученні та щотижня до 84-денного віку, збереженість поголів'я від відлучення до забою, споживання корму під час відгодівлі, стан здоров'я.

2.3. Розрахунок економічної ефективності вирощування молодняку кролів при використанні МКБ

При визначенні економічної ефективності використанні МКБ при вирощуванні молодняку кролів були враховані такі показники: вартість кормової добавки, оплата робочого часу, витраченого на його застосування, накладні витрати, додатково отримана продукція. Економічну ефективність визначали загальноприйнятими методами [362] з розрахунком пов’язаних з їх застосуванням витрат, додаткової виручки, одержаного прибутку та рентабельності (окупності) додаткових витрат.

Усі розрахунки виконували згідно з цінами та тарифними ставками станом на липень 2019 р.

2.4. Статистичні методи обробки результатів

Результати експериментальних даних обробляли загальноприйнятими методами математичної статистики [298]. Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel. Поріг статистичної похибки різних тестів був встановлений на рівні 5 %. Характер даних описової статистики залежав від типу змінних. Розраховували середнє значення, стандартне відхилення, і процентні частини для порядкових або

номінальних змінних. Для порівняння даних використовували t-тест (Ст’юдента).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Склад мікробіоти ШКК молодняку кролів за різних типів годівлі та дієти

Відомо, що макроорганізм та мікробіота ШКК – єдина екологічна система, яка перебуває в стані динамічної рівноваги. На мікробіоту, що колонізує травний тракт тварин, впливає низка факторів, основним з яких є дієта. Варто зазначити, що кролики дуже чутливі до складу раціону, порушення якого здатне легко викликати кишкові розлади, які можуть мати тяжкі наслідки [72].

Корми й годівля є важливою складовою частиною сучасної технології виробництва продукції тваринництва, зокрема галузі кролівництва. Відомо, що дані чинники найістотніше впливають на продуктивність та відтворні функції кролів. Залежно від умов утримання і забезпеченості кормами у кролівницьких господарствах застосовують комбінований (змішаний) та сухий (концентратний) типи годівлі. Норми годівлі складають з урахуванням сезону, живої маси, віку та фізіологічного стану тварин [393].

У природних умовах кількісний та видовий склад нормальної мікробіоти ШКК кролів поповнюється внаслідок копрофагії. В умовах промислового кролівництва природний процес утворення цекотрофів порушується, оскільки відсутній зв’язок з ґрунтом, зеленою масою рослин, що зумовлює необхідність застосування пробіотиків.

Незначна кількість даних у літературі щодо впливу типу годівлі та його компонентів на мікробіоту кишечника молодняку кролів спонукала нас провести дослідження з цього питання.

Видовий склад облігатної мікробіоти ШКК молодняку кролів за різних типів годівлі представлений в таблиці 3.1. Відсутність патогенних мікроорганізмів (*Salmonella, Shigella, гемолізуюча кишкова паличка та ін.*) у вмістимому кишківника молодняку кролів обумовлена дотриманням санітарно-гігієнічних правил їх утримання та використанням якісних кормів.

За концентратного типу годівлі кількість біфідобактерій у шлунково-кишковому каналі молодняку кролів збільшувалася приблизно в 10 разів у порівнянні з комбінованим типом годівлі та становила $(5,8\pm0,6)\times10^7$ КУО/г. Виявлено, що тип годівлі не впливав на кількість молочнокислих бактерій у ШКК дослідних тварин.

Таблиця 3.1.

Склад мікробіоти ШКК молодняка кролів за різних типів годівлі, КУО/г (M±m, n=6)

Групи мікроорганізмів	Тип годівлі	
	Концентратний	Комбінований
Біфідобактерії	$(5,8\pm0,6)\times10^7$	$(4,2\pm0,2)\times10^6$*
Молочнокислі бактерії	$(7,4\pm0,3)\times10^8$	$(7,4\pm0,3)\times10^8$
Загальна кількість кишкової палички	$(5,8\pm0,3)\times10^5$	$(8,7\pm0,7)\times10^5$*
Кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю,%	86,25±2,25	88,45±3,25
Кишкова паличка зі слабко вираженою ферментативною активністю, %	13,75±2,25	11,55±3,25
Гемолізуюча кишкова паличка, %	0	0
Дріжджеподібні гриби	$(1,2\pm0,2)\times10^5$	$(9,8 \pm 1,2)\times10^3$*
Анаеробні бацили	$(2,2\pm0,3)\times10^2$	$(3,0 \pm 0,5)\times10^2$

Примітка: * − $P < 0,05$ порівняно до концентратного типу годівлі.

Кишкова паличка є основним аеробом кишківника тварин та людини, саме вона використовує кисень, що потрапляє з кормом, створюючи анаеробні умови для забезпечення життєдіяльності біфідобактерій та лактобактерій. Загальна кількість кишкової палички знаходилась в межах 5,8-8,7 $\times10^5$ КУО/г залежно від типу годівлі. Кишкова паличка з нормальною ензимною активністю становила 86,25-88,45 %, кишкова паличка зі слабко вираженою ензимною активністю — 11,55-13,75 % від загальної кількості. Слід зазначити, що кишкова паличка зі слабко вираженою ферментативною активністю не завдає шкоди макроорганізму.

Серед представників факультативної мікробіоти виявлені анаеробні бацили та дріжджеподібні гриби. Кількість анаеробних бацил складала (2,2±0,3)×10^2 КУО/г; кількість дріжджеподібних грибів підвищувалася приблизно у 12 разів і становила (1,2±0,2)×10^5 КУО/г за концентратного типу годівлі. Виявлені нами дріжджеподібні гриби скоріше за все не є порушення балансу мікробіоти ШКК, оскільки вони не є переважаючими серед досліджуваних груп мікроорганізмів. Збільшення чисельності дріжджеподібніх грибів, на нашу думку, спричинено високою контамінацією кормів (зазначеними грибами).

Дані щодо складу мікробіоти шлунково-кишкового каналу молодняку кролів, утвореного за комбінованого типу годівлі узгоджуються з результатами І. І. Асадулиної та В. З. Галимової [279], поряд із тим, у наших дослідах відмічено більшу кількість молочнокислих бактерій.

Виявивши відмінності мікробіоти ШКК молодняку кролів за різних типів годівлі, надалі було досліджено вплив дієти на баланс кишкової мікробіоти. Отримані дані представлені в табл. 3.2. Встановлено, що дієта також істотно впливає на баланс мікробіоти у ШКК молодняку кролів.

Відомо, що молочнокислі бактерії разом із біфідобактеріями − найбільш значущі представники ендогенної кишкової мікробіоти людини та тварин. Варто зазначити, що кількість біфідобактерій суттєво знижувалась за використання дієти, основу якої складає сіно у порівнянні з іншими групами. У всіх групах даний показник знаходився в межах від 10^5 до 10^7 КУО/г, залежно від дієти. Однак кількість біфідобактерій значно збільшувалась і становила (5,5±0,8)×10^7 КУО/г за використання дієти на основі зеленої маси лучних трав (1 група), проти тварин, яким згодовували зерно (3 група) — (3,5±0,9)×10^7 КУО/г та сіно (2 група) — (7,4±1,5)×10^5 КУО/г. МКБ також виявлялись у різній кількості (від 10^5 до 10^9 КУО/г) у дослідних групах. Збільшення кількості молочнокислих бактерій виявлено у кролів 3-ї групи, яким згодовували зерно, що узгоджується з даними інших дослідників [344], і становило (2,5±0,5)×10^9 КУО/г, в той час, як у тварин,

яким згодовували зелену масу (1 група) — $(3,4\pm0,2)\times10^8$ КУО/г, сіно (2 група) — $(6,2\pm0,8)\times10^5$ КУО/г.

Таблиця 3.2

Склад мікробіоти шлунково-кишкового каналу молодняку кролів залежно від компонентів раціону за комбінованого типу годівлі, КУО/г (M±m, n=6)

Групи мікроорганізмів	Групи тварин		
	перша (зелена маса)	друга (сіно)	третя (зерно)
Біфідобактерії	$(5,5\pm0,8)\times10^7$*	$(7,4\pm1,5)\times10^5$*	$(3,5\pm0,9)\times10^7$*
Молочнокислі бактерії	$(3,4\pm0,2)\times10^8$	$(6,2\pm0,8)\times10^5$*	$(2,5\pm0,5)\times10^9$*
Загальна кількість кишкової палички	$(6,4\pm0,3)\times10^5$	$(2,2\pm0,3)\times10^4$*	$(5,0\pm0,7)\times10^6$*
Кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю, %	89,33±3,75	88,66±2,33	90,50±3,33
Кишкова паличка зі слабко вираженою ферментативною активністю, %	10,67±3,75	11,34±2,33	9,50±3,33
Гемолізуюча кишкова паличка, %	0	0	0
Дріжджеподібні гриби	$(1,8\pm0,2)\times10^4$*	$(4,2\pm0,2)\times10^3$	$(3,4\pm0,7)\times10^3$
Анаеробні бацили	$(5,0\pm0,7)\times10^4$*	$(5,37\pm0,7)\times10^9$*	$(2,5\pm0,5)\times10^2$

Примітка: * − $P < 0,05$ порівняно до комбінованого типу годівлі.

Зменшення кількості біфідобактерій та МКБ бактерій є ознакою дисбактеріозу. Тому можна зробити висновок, що введення в раціон молодняку кролів сіна у великій кількості призводить до порушення балансу кишкової мікробіоти.

Встановлено, що залежно від дієти у дослідних групах змінювалась загальна кількість кишкової палички й знаходилась в межах від 10^4 до 10^6 КУО/г. У

тварин, основну частку раціону яких складало зерно пшениці та вівса, збільшувалася кількість кишкової палички і становила $(5,0\pm0,7)\times10^6$ КУО/г, а сіно (3 група) й зелена маса (1 група) — $(2,2\pm0,3)\times10^4$ КУО/г та $(6,4\pm0,3)\times10^5$ КУО/г відповідно. Однак дієта суттєво не впливала на співвідношення кишкової палички з нормальною ферментативною активністю та зниженою ферментативною активністю. Встановлено, що у кролів першої групи кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю становить 89,33±3,75 %, другої групи — 88,66±2,33 %, третьої — 90,50±3,33 %. Встановлено, що її кількість знаходиться на рівні 10,67 ± 3,75 % у тварин першої групи, 11,34±2,33 % — другої та 9,50±3,33 % — третьої.

Дієта впливала на кількість дріжджеподібних грибів. Відмічено збільшення кількості дріжджеподібних грибів у кролів, яким згодовували зелену масу (1 група) і становила $1,8\times10^4$ КУО/г, тоді як у тварин, яким згодовували сіно (2 група) — $4,2\times10^3$ КУО/г, а зерно (3 група) — $3,4\times10^3$ КУО/г.

Кількість анаеробних бацил значно зростала у кролів, основу раціону яких складало сіно (2 група), і становила $5,37\times10^9$ КУО/г у порівнянні з тваринами інших дослідних груп.

Патогенних мікроорганізмів не виявлено в усіх дослідних групах.

Отже, у ході досліджень встановлено вплив типу годівлі на баланс мікробіоти ШКК молодняку кролів. Встановлено, що за концентратного типу годівлі збільшується кількість біфідобактерій та дріжджеподібних грибів.

Досліджено вплив компонентів комбінованого типу годівлі на склад мікробіоти шлунково-кишкового каналу молодняку кролів. Виявлено, що окремі компоненти раціону при комбінованому типі годівлі по-різному впливають на кількісний склад мікробіоти кишківника молодняку кролів. Визначено, що введення в раціон кролів значної частки сіна призводить до зменшення кількості біфідобактерій та збільшення кількості анаеробних бацил, що спричиняє дисбактеріоз. Дієта, основу якої складає зерно, спричинює підвищення кількості молочнокислих бактерій та зниження кількості дріжджеподібних грибів.

3.2. Скринінг молочнокислих бактерій

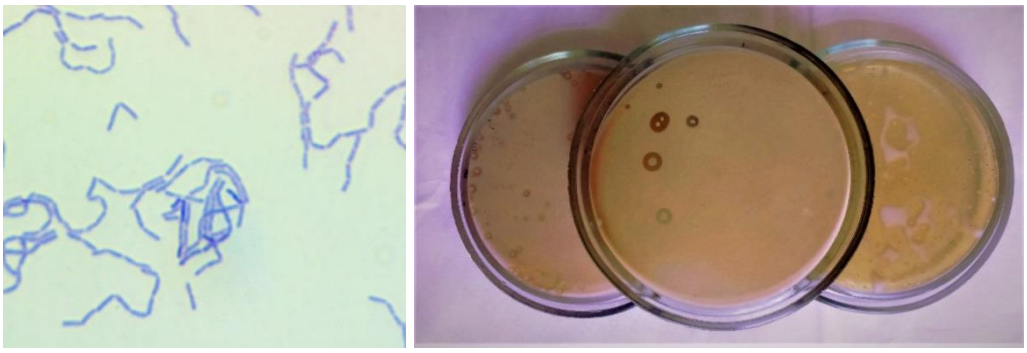
3.2.1. Виділення бактерій роду *Lactobacillus* зі шлунково-кишкового каналу

Відомо, що найбільш ефективними є напрямки селекції штамів для пробіотичних препаратів, саме видоспецифічних мікроорганізмів для кишкової мікробіоти конкретного виду тварин [363].

Перспективною групою мікроорганізмів для створення пробіотичного препарату для кролів є бактерії роду *Lactobacillus*, які мають статус «GRAS». Слід також зазначити, що чисельність молочнокислих бактерій у шлунково-кишковому каналі кролів перевищує чисельність біфідобактерій [372], тому можна припустити, що їх функціональна роль більш значуща.

Виділено та досліджено 250 ізолятів МКБ з 50 біологічних зразків, наданих приватними господарствами після забою тварин. Для подальшої роботи ми відбирали ізоляти, що проявляли стабільні властивості, були виділені в чисту культуру та мали клітини паличкоподібної форми. Дані представлено в додатку А.

Встановлено, що клітини більшості представників МКБ, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів, мають форму прямих паличок із закругленими кінцями, зібраних у ланцюжки різної довжини, або розташовані поодиноко або попарно (рис. 4.1). При фарбуванні за Грамом або метиленовим синім у деяких ізолятів спостерігалася зернистість. Всі клітини досліджуваних культур були нерухомі. Виділені ізоляти не виявляли каталазної активності. В агаризованому середовищі MRS досліджувані бактерії утворювали колонії білого кольору діаметром 1,0-2,0 мм у вигляді «човників» або дисків (рис. 4.1). Зазвичай колонії дрібні, але у деяких варіантах їх розмір перевищував 4 мм у діаметрі. Колонії, як правило, не пігментовані, білі або кремового кольору.



А Б

Рис. 3.1. **Культурально-морфологічні властивості МКБ, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів:**
А – мікроскопія МКБ, культивованих на середовищі MRS, збільшення×630 разів; Б – колонії МКБ на капустяному агарі.

При глибинному посіві досліджуваних ізолятів на тверде живильне середовище утворюються щільні колонії у вигляді правильних лінз (сочевицеподібні), а також трикутної та неправильної форми. При додаванні в середовище крейди, навколо колоній внаслідок накопичення молочної кислоти утворюється зона розчинення крейди (рис. 3.1). При вирощуванні на рідких поживних середовищах досліджувані ізоляти спричиняють рівномірне помутніння, після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчастого осаду, ніколи не утворюючи плівок на поверхні середовища.

У процесі дослідження встановлено, що температурний діапазон росту бактерій складав від +15 °С до +45 °С, оптимальна температура для їх росту складала (37±2) °С.

Враховуючи вищезазначене, за фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками досліджувані ізоляти були попередньо віднесені до бактерій роду *Lactobacillus*.

3.2.2. Дослідження кислотоутворюючої активності МКБ

Наступним етапом досліджень було встановлення кислотоутворюючої здатності ізолятів. Активність кислотоутворення є одним із суттєвих показників придатності культур МКБ для створення пробіотичних препаратів, оскільки їх антагоністична активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів обумовлена в першу чергу дією органічних кислот, що знижують pH середовища [142]. Також з літературних джерел відомо, що середовище шлунку кролів є кислішим ніж у більшості тварин та в людини [390].

Активність кислотоутворення є нормованим показником специфічної активності пробіотиків і відповідно критерієм відбору штамів МКБ при розробці нових бактеріальних препаратів [345]. Штами, титруєма кислотність яких коливається в межах 20-80 °Т, вважаються неактивними, а ті у яких цей показник понад 120 °Т-високоактивними [407]. Розрізняють граничну та титруємо кислотоутворюючу здатність. Встановлено дуже сильну кореляцію (r=0,94) між титруємою та граничною кислотністю (рис. 3.2.). Тому первинний відбір ізолятів, виділених зі ШКК кролів, проводили за граничним значенням кислотоутворення–кількість кислоти утвореної МКБ, культивованими упродовж 14 діб на стерильному знежиреному молоці.

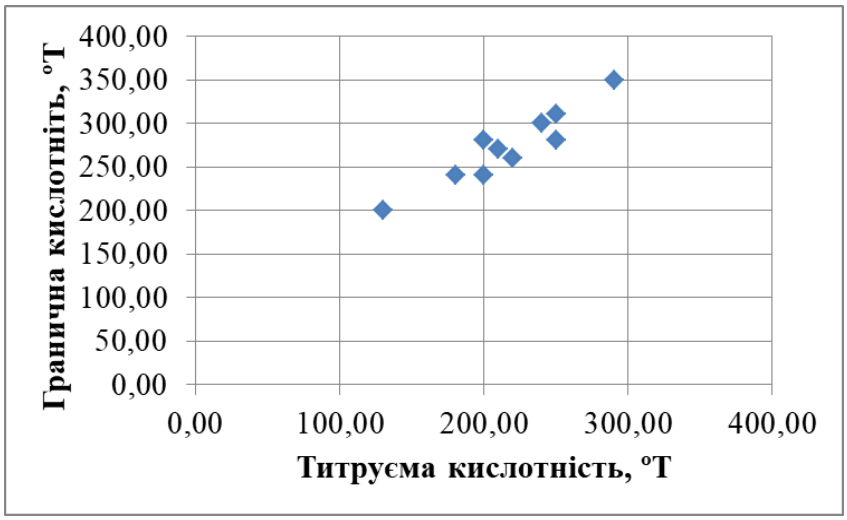


Рис. 3.2. **Кореляція титруємого та граничного кислотоутворення бактерій роду *Lactobacillus*** (se=0,377, нижня 95 % межа (rL)=0,760, верхня 95 % межа (rU)=0,986)

Значення граничної кислотності для 145 ізолятів, що склало 58 % від загальної кількості бактерій, не перевищувало 99 °Т. Разом з тим, 10 ізолятів проявляли кислотоутворюючу активність, вищу за 200 °Т, що становило лише 4 % від загальної кількості досліджуваних бактерій. Більша частина ізолятів– 145 (58 % від загальної кількості) – характеризувалися активністю кислотоутворення, яка не перевищувала 99 °Т (рис. 3.3.). 35 % ізолятів проявляли кислотоутворюючу активність на рівні 100-149 °Т, 3 % – на рівні 150-199 °Т. Найвищою активністю кислотоутворення (понад 200 °Т) відзначалися 10 ізолятів МКБ (4 % від загальної кількості), які були відібрані нами для подальшої роботи. За даним критерієм нами обрано 10 ізолятів МКБ: L-4/1,L-5/4, L-13/2, L-16/1, L-16/3, L-17/2, L-17/3, L-31/2, L-39/2, L-49/1 (табл.3.4).

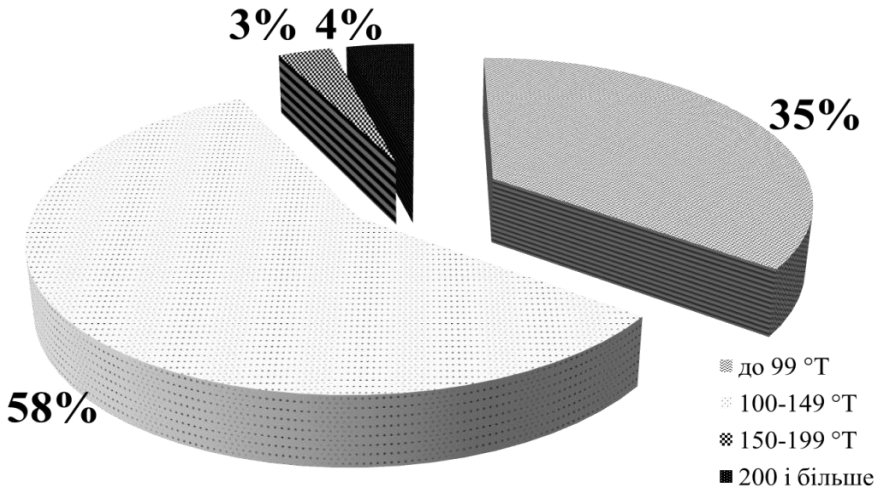


Рис. 3.3. **Граничне кислотоутворення бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів (n=3)**

Таблиця 3.4

Біологічні властивості ізолятів МКБ, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів

Назва ізоляту	Морфологія клітин	Спороутворення	Рухливість	Желатиназна активність	Каталазна активність	Нітратредуктазна активність	Кислотоутворення, °Т	
							титруєме	граничне
L-4/1	тонкі короткі** палички в ланцюжках	-	-	-	-	-	240	300
L-5/4	тонкі короткі** палички або закручені в легку спі- раль	-	-	-	-	-	200	280
L-13/2	тонкі, дуже довгі* палички	-	-	-	-	-	290	350
L-16/1	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	220	260
L-16/3	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	250	280
L-17/2	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	180	240
L-17/3	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	210	270
L-31/2	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках	-	-	-	-	-	250	310
L-39/2	довгі* поодинокі палички	-	-	-	-	-	200	240
L-49/1	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках	-	-	-	-	-	130	200

Примітка*:* *довжина клітини більше 7 мкм; **довжина клітини менше 5 мкм; + - позитивний результат; - - негативний результат.

3.2.3. Параметри росту та протеолітична активність МКБ

У біотехнологічному процесі створення пробіотиків велику увагу приділяють виходу біомаси життєздатних клітин бактерій. При селекції штамів слід враховувати їх технологічність, а саме здатність швидко рости та накопичуватись на простих дешевих живильних середовищах [335].

Відмінності між ізолятами стосовно росту було виявлено на підставі аналізу параметрів росту, а саме: питомої швидкості росту (μ, год–1), тривалості лаг-фази (T_1), константи швидкості поділу (число поділу клітини за 1 год) (v, год$^{-1}$) і терміну регенерації, що характеризує час, необхідний для одного циклу поділів клітини (g, год) (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Параметри росту МКБ у стерильному знежиреному молоці

Назва ізоляту	МЗА, год	Чисельність бактерій, lg КУО/мл	μ_{max}, год $^{-1}$	T_l, год	v, год $^{-1}$	g, год
L-4/1	6,27±0,18	7,46±0,30	0,56	1,95	0,15	6,67
L-5/4	16,27±0,18	8,05±0,13	0,37	3,00	0,17	5,88
L-13/2	4,8±0,13	8,17±0,11	0,76	1,76	0,51	1,80
L-16/1	14,4±0,27	8,08±0,11	0,42	2,94	0,20	5,00
L-16/3	13,5±0,13	7,68±0,28	0,66	2,20	0,51	1,18
L-17/2	14,43±0,08	7,93±0,04	0,72	1,95	0,56	1,80
L-17/3	13,1±0,13	8,08±0,11	0,42	2,94	0,15	6,67
L-31/2	5,2±0,13	7,76±0,19	0,76	1,76	0,51	2,00
L-39/2	5,8± 0,13	7,40±0,09	0,76	1,76	0,51	2,00
L-49/1	5,1± 0,13	8,31±0,11	0,90	1,95	0,56	1,80

Встановлено,що з-поміж досліджуваних МКБ найактивніші були ізоляти: L-13/2, L-31/2 та L-39/2. Ці культури починали рости після невеликої фази затримки росту — показник T_l найменший, у порівнянні з рештою досліджуваних бактерій. Активний ріст у періодичній культурі тривав 8 год, із питомою швидкістю у log-фазі 0,76-0,90 год.

Однак ізолят L-16/3 відтворювався швидше, термін регенерації був коротший у 1,53-1,69 рази у порівнянні з ізолятами 13/2, L-39/2 та L-39/2.

Чисельність у стаціонарній фазі відмічена дещо більша в ізоляту L-39/2 і становила 8,31±0,11 lg КУО/мл.

Варто зазначити, що ізоляти L-5/4, L-16/1, L-17/потребували більшого адаптаційного періоду перед активним ростом — від 2,94 до 3,00 год. Після фази затримки росту вони росли з помірною швидкістю μ_{max} (0,37–0,42) год$^{-1}$ тривалий час — від 7 до 10 год залежно від ізоляту.

Встановлено, що молокозцідальна активність (МЗА) є штамоспецифічною, швидше заквашували молоко ізоляти: L-4/, L-13/2, L-31/2, L-39/2, L-49/1, значення показника МЗА коливалось у межах 4,8–6,27 год. Швидкість скисання молока дуже слабо залежала від кислотоутворюючої здатності (r=0,152) та слабо від чисельності бактерій у стаціонарній фазі росту (r=-0,278), однак трохи більше від протеолітичної активності (r=-0,347). Тому на нашу думку, МЗА залежить від продукування екзополісахаридів. Екзополісахариди МКБ мають унікальні властивості, що зумовлюють їх використання у харчовій промисловості як зв'язувальних, стабілізувальних, гелеутворювальних агентів, що здатні впливати на час скисання молока [151].

Як було зазначено в розділі 1.3, більшість дослідників при відборі пробіотичних штамів бактерій основну увагу приділяють їх антагоністичним й адгезивним властивостям. Значення протеолітичної активності молочнокислих бактерій дуже важливе, оскільки навіть частковий розпад білків протеолітичними ферментами молочнокислих бактерій покращує засвоюваність продуктів.

Встановлено, що у досліджуваних штамів молочнокислих бактерій наявна протеолітична активність, яка проявлялась під час гідролізу казеїну (рис. 3.4). Зона гідролізу казеїну становила від 0,7 до 3,3 мм.

Проаналізувавши дані параметрів росту та протеолітичної активності, найбільш перспективним за цими параметрами є ізолят L-13/2.

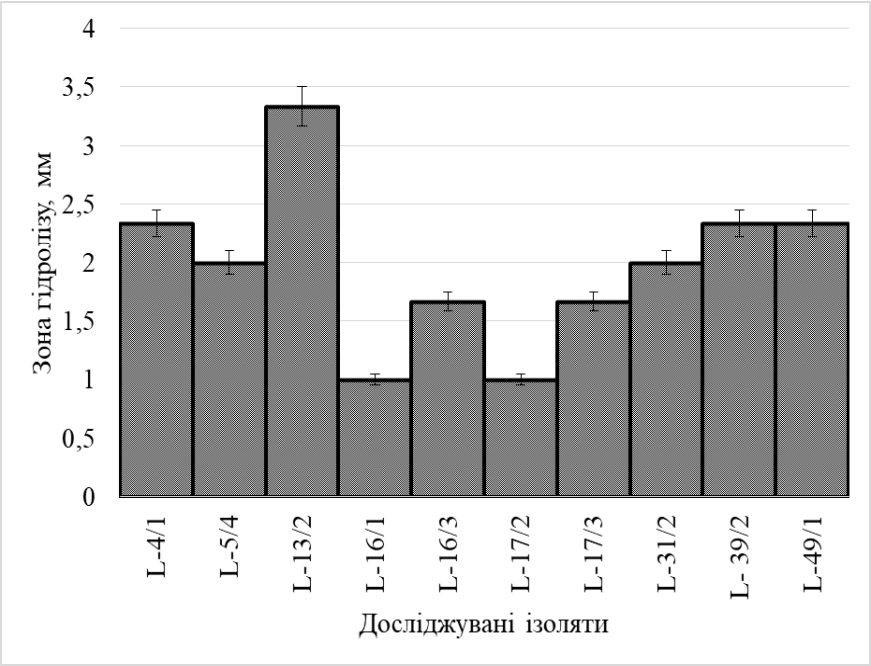


Рис. 3.4. **Протеолітична активність досліджуваних ізолятів**

3.2.4. Дослідження можливості сумісного культивування МКБ

Відомо, що сучасні пробіотичні препарати створюються переважно на основі декількох штамів або видів мікроорганізмів. Тому наступним етапом наших досліджень було встановлення можливості сумісного культивування досліджуваних МКБ. Показано, що МКБ, виділені зі ШКК кролів, не проявляють антагоністичної активності по відношенню один до одного (таблиця 3.6).

При спільному культивуванні на рідких живильних середовищах досліджувані ізоляти накопичувались у високій кількості (10^9 КУО), а при мікроскопії спостерігались клітини, характерні для різних ізолятів (додаток Б). Так само методом спільного культивування на щільному живильному середовищі встановлено, що ізоляти сумісні (зона контакту культур згладжена). Тому можна зробити висновок, що всі досліджувані штами молочнокислих бактерій є біосумісними.

Таблиця 3.6

Біосумісність ізолятів бактерій роду *Lactobacillus*

Досліджувані Ізоляти	L-4/1	L-5/4	L-13/2	L-16/1	L-16/3	L-17/2	L-17/3	L-31/2	L-39/2	L-49/1
L-4/1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-5/4	-		-	-	-	-	-	-	-	-
L-13/2	-	-		-	-	-	-	-	-	-
L-16/1	-	-	-		-	-	-	-	-	-
L-16/3	-	-	-	-		-	-	-	-	-
L-17/2	-	-	-	-	-		-	-	-	-
L-17/3	-	-	-	-	-	-		-	-	-
L-31/2	-	-	-	-	-	-	-		-	-
L-39/2	-	-	-	-	-	-	-	-		-
L-49/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примітка: «-» - відсутність антагоністичної активності

3.2.5. Антагоністична активність МКБ

Як вже зазначалось, однією з найважливіших вимог до пробіотичних мікроорганізмів є здатність пригнічувати ріст умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів. Зважаючи на це, було досліджено антагоністичні властивості 10 ізолятів МКБ, виділених від кролів (табл. 3.7).

Встановлено, що досліджувані бактерії виявляють різний ступінь пригнічувальної дії на досліджувані тест-культури (рис. 3.5). Зона затримки росту істотно відрізнялась у порівнянні з типовим представником МКБ (*L. acidophilus* CCM 4833). Антагоністична дія досліджуваних мікроорганізмів залежала від виду тест-мікроорганізмів. Встановлено, що лише ізоляти L-16/1 та L-39/2 проявляють нижчий рівень антагоністичної активності у порівнянні з типовим представником МКБ. Високу антагоністичну активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів виявлено у досліджуваних ізолятів: L-4/1, L- 5/4, L- 13/2, L-17/2, L- 17/3, L- 49/1.

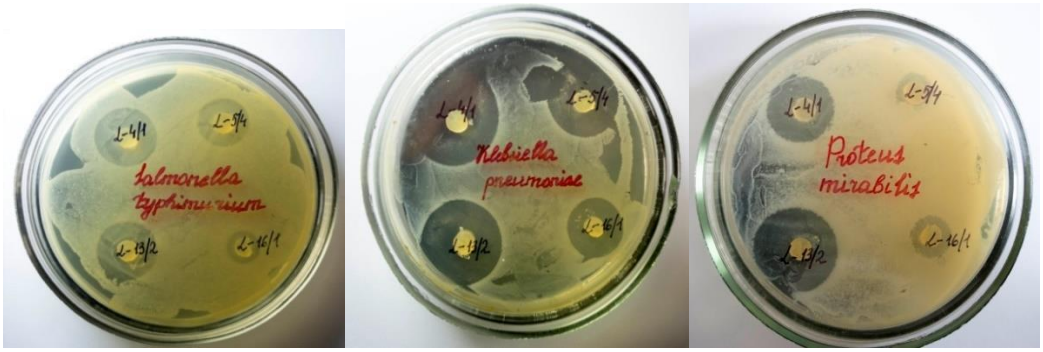


Рис. 3.5. **Зони затримки росту тест-культур.**

Антагоністична активність досліджуваних ізолятів МКБ залежала від виду тест-мікроорганізмів. Встановлено, що під впливом 50 % досліджуваних ізолятів бактерій (зокрема, L-4/1, L-13/2, L-17/2, L-17/3, L-49/1) зони інгібування росту *Salmonella typhimurium* № 89 були понад 20 мм. Проте зони затримки росту *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko* були більш як 20 мм лише під впливом 20 % досліджуваних ізолятів: L-13/2 і L-17/2.

Найвищу антагоністичну активність встановлено в ізоляту L-13/2, що спричиняв утворення зон інгібування росту 20 мм або більше до всіх використаних у роботі тест-культур, окрім *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 і *Staphylococcus aureus* № 906.

Таблиця 3.7

Антагоністична активність бактерій роду *Lactobacillus* , виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів, до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (M ± m, n = 8).

Досліджувані ізоляти	Середні зони інгібування росту умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів, мм								
	Proteus mirabilis	*Proteus vulgaris*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella typhimurium*	*Shigella flexneri*	*Klebsiella pneumoniae*	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella enteritidis*
L-4/1	22,0±0,2*	22,7±0,5*	18,0±1,2*	21,0±0,1*	16,5±2,2*	32,0±1,8*	19,5±0,7*	17,7±0,1*	14,0±0,2
L-5/4	18,0±2,0	16,5±1,0	16,7±0,2	16,0±0,1*	14,0±0,2*	20,0±1,8	18,3±0,2	15,0±0,7*	14,0±0,5*
L-13/2	27,0±0,1*	23,0±1,5*	19,3±1,2*	20,0±0,1*	20,0±0,1*	28,0±2,2*	20,5±0,1*	18,0±1,8*	20,0±0,5*
L-16/1	18,5±0,1	19,5±1,0*	12,7±0,2*	13,0±2,7*	17,0±0,7*	18,0±2,0*	14,0±1,5*	14,0±0,7*	13,0±0,7
L-16/3	14,3±0,7*	18,0±0,5	19,0±0,7*	18,3±0,2*	15,0±1,8*	14,0±0,1*	16,7±0,8	16,7±0,8*	17,0±1,2*
L-17/2	20,0±1,0*	20,0±1,5*	14,3±0,1*	21,0±0,1*	12,7±0,6*	21,0±1,2	18,7±0,2	21,0±1,5*	20,0±2,8*
L-17/3	17,2±0,7	16,5±0,5	16,3±1,7	20,0±1,0*	16,0±0,1*	15,0±0,2*	17,0±0,7	19,0±0,7*	16,0±0,1*
L-31/2	19,2±0,5*	18,3±0,5	17,0±0,1	17,0±0,7	11,0±0,3*	17,0±0,8*	15,0±0,7*	15,0±0,2*	14,0±0,2*
L- 39/2	17,8±0,5	18,0±1,0	12,7±0,7*	12,0±0,2*	15,0±0,5*	16,0±0,2*	12,7±0,1*	12,0±0,2	14,0±1,2
L-49/1	22,3±1,5*	20,3±0,5*	20,0±2,0*	22,0±1,8*	24,0±1,5*	18,0±1,7*	19,7±0,7*	17,0±1,7*	17,0±0,2*
L. acidophilus CCM 4833	18,0±0,4	17,0±1,2	16,3±0,7	17,0±0,2	18,0±0,3	20,0±1,8	18,0±0,5	12,0±0,7	13,0±0,2

Примітка:* − P < 0,05 – істотна різниця порівняно зі штамом *L. acidophilus* CCM 4833

Відомо, що деякі штами МКБ можуть стимулювати активність один одного [25, 177, 293]. У попередніх наших дослідженнях було встановлено можливість сумісного культивування досліджуваних штамів молочнокислих бактерій. Тому було важливо перевірити антагоністичну активність найактивніших досліджуваних ізолятів при сумісному культивуванні. Одержані нами результати свідчать про те, що спільне культивування впливає на зону затримки росту (ЗЗР) патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (таблиця 3.8.) у порівнянні з поодиноким культивуванням (таблиця 3.7).

У чотирьох варіантах (L-17/2+L-13/2, L-4/1+L-49/1, L-4/1+L-13/2 та L-4/1+L-17/2) за сумісного культивування ізолятів ЗЗР деяких тест – культур збільшувались. Також слід зазначити, що у деяких випадках при сумісному культивуванні досліджуваних ізолятів спостерігалось зменшення ЗЗР патогенних мікроорганізмів. Це може бути пов'язано з інактивацією бактеріями антимікробних факторів або з негативним впливом на метаболізм один одного [385].

Отримані дані свідчать про те, що ізольовані нами з травної системи кролів бактерії роду *Lactobacillus* мають високий бактеріостатичний потенціал щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, а тому застосування найперспективніших штамів у тваринництві як пробіотиків, може вплинути на рівень шлунково-кишкових захворювань тварин, викликаних кишковими інфекціями.

Таблиця 3.8

Антагоністична активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із шлунково-кишкового каналу кролів, при сумісному культивуванні (M ± m, n = 3).

Досліджувані бактерії	Середні зони затримки росту умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів, мм								
	Proteus mirabilis	*Proteus vulgaris*	*Staphylococcus aureus*	*Salmonella typhimurium*	*Shigella flexneri*	*Klebsiella pneumoniae*	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella enteritidis*
*L- 17/2+ L-*13/2	22,0±0,2 C b	22,0±0,5	20,0±0,1 C b	23,0±0,7 C B	22,0±0,5 C B	30,0±2,3 C	19,0±0,7 C	25,0±1,8 C B	18,0±0,7 c b
L-4/1+*L*-49/1	18,0±1,2 ad	16,0±0,7 ad	18,0±0,3 d	17,0±1,2 ad	18,0±0,1 Ad	21,0±1,2 a	18,0±0,1 aD	20,0±2,2 AD	16,0±0,3 Ad
L-17/2+ *L*-49/1	14,0±0,5 cd	16,7±0,3 cd	16,0±0,3 Cd	20,0±2,2 cd	21,0±1,8 Cd	18,7±0,7 c	18,0±0,7 D	18,5±1,7 c	14,0±0,2 cd
L-13/2+*L*-49/1	17,0±0,1 cd	19,5±1,2	18,0±0,1 cd	17,0±0,7 cd	16,0±0,7 cd	18,0±1,2 c	21,0±2,2 D	19,0±1,7	16,0±0,7 c
L-4/1+*L*-13/2	20,7±0,7 ac	20,0±0,2 c	21,0±0,7 Ac	16,0±0,1 ac	19,7±1,2 Ac	19,3±0,7 ac	23,0±2,2 AC	18,0±0,5	14,0±0,1 C
L-4/1+*L*- 17/2	16,0±0,2 ac	22,7±2,2 C	20,3±1,8 AC	17,0±0,8 ac	20,0±1,8 AC	16,3±0,7 ac	16,7±0,1 ac	17,0±0,5 c	11,0±0,1 ac

Примітка:A – збільшення ЗЗР порівняно з ізолятом *L*-4/1; B − збільшення ЗЗР порівняно з ізолятом з ізолятом *L*-13/2; C − збільшення ЗЗР порівняно з ізолятом *L*-17/2; D − збільшення ЗЗР порівняно з ізолятом 49/1; a – зменшення ЗЗР порівняно з ізолятом *L*-4/1; b − зменшення ЗЗР порівняно з ізолятом з ізолятом *L*-13/2; c − зменшення ЗЗР порівняно з ізолятом *L*-17/2; d − зменшення ЗЗР порівняно з ізолятом 49/1.

3.2.6. Вплив кислотоутворення та середовища культивування на антагоністичну активність МКБ

Утворення МКБ органічних кислот (молочної та оцтової) вважається одним з механізмів антагоністичної активності щодо умовно-патогенних мікроорганізмів [284]. Однак антагоністичну дію пробіотичних бактерій, інколи обумовлюють нейтральні продукти, які виділяють бактерії в навколишнє середовище [173]. Окремі речовини, які продукують молочнокислі бактерії, характеризуються високою антагоністичною активністю навіть за їх низьких концентрацій у середовищі. До цієї категорії належать антибіотичні речовини (лактоцил, лактобревін, низин, лактобацилін тощо) [12, 21]. Згідно з літературними даними молочнокислі бактерії здатні продукувати перекис водню [172]. Крім того, перекис водню активує лактопероксидазну систему, що утворює продукти окислення — інгібітори для широкого спектра грампозитивних і грамнегативних бактерій [131]. Встановлено ще один механізм антибактеріальної активності молочнокислих бактерій — здатність продукувати лізоцим, який руйнує стінку бактеріальних клітин, створюючи неспецифічний антибактеріальний бар’єр [284]. Антагоністична дія деяких молочнокислих бактерій характеризується бактерицидними властивостями речовин білкової природи (бактеріоцини) [183].

У результаті наших досліджень було встановлено, що ЗЗР тест культур у різних досліджуваних ізолятів відрізнялася. Однак збільшення ЗЗР не пов'язано зі кислотоутворенням (табл. 3.9).

З вищевказаних результатів зрозуміло, що на антагоністичну активність досліджуваних ізолятів фактор кислотоутворення має непрямий вплив. Тому можна припустити, що розмір ЗЗР тест культур обумовлений продукуванням інших речовин, що проявляють бактерицидну дію.

Таблиця 3.9

Кореляція між антагоністичною активністю та кислото утворенням

Тест-культури	Коефіцієнт кореляції Пірсона (r)	Довірчий інтервал (95%)		Значення сили зв'язку між змінними
		Нижня межа (rL)	Верхня межа (rU)	
Proteus mirabilis	0,165478	-0,51675	0,719168	дуже слабка
Proteus vulgaris	0,274617	-0,42768	0,342493	слабка
Staphylococcus aureus	0,169112	-0,514	0,720969	дуже слабка
Salmonella typhimurium	-0,11605	-0,69392	0,552751	дуже слабка
Shigella flexneri	-0,28158	-0,77323	0,4215	слабка
Klebsiella pneumoniae	0,345087	-0,36188	0,800054	слабка
Escherichia coli	0,345087	-0,36188	0,800054	слабка
Pseudomonas aeruginosa	-0,03729	-0,65053	0,605379	дуже слабка
Salmonella enteritidis	0,03633	-0,60599	0,649973	дуже слабка

Примітка: se=0,377.

Спираючись на вищезазначене, ознака кислотоутворення не може бути вирішальною при відборі штамів для виготовлення пробіотиків.

Також залишається не вирішеним питання вибору живильного середовища культивування молочнокислих бактерій для дослідження антагоністичної активності. Виявлено, що антагоністична активність молочнокислих бактерій до патогенних мікроорганізмів змінювалася залежно від живильного середовища, на якому культивували досліджувані ізоляти [370]. При культивуванні МКБ на агаризованому гідролізованому молоці ЗЗР патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів збільшувалися до 20 % у порівнянні з зонами на агаризованому знежиреному молоці. Проте при вирощуванні цього ж штаму на живильному середовищі MRS зони пригнічення росту тест-штаму збільшились ще до 10 % проти цього ж показника за культивування на агаризованому гідролізованому молоці. Наприклад, у 82 % досліджуваних

штамів молочнокислих бактерій при культивуванні на агаризованому гідролізованому молоці та середовищі MRS встановлено збільшення зон пригнічення росту *Escherichia coli* на 45 % та 52 % відповідно проти варіанту культивування молочнокислих бактерій на агаризованому знежиреному молоці.

Це обумовлено тим, що бактерії роду *Lactobacillus* є ауксотрофними організмами і тому надзвичайно вибагливі до живильних середовищ [381]. Тому збільшення зон затримки росту патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів за їх культивування на середовищі MRS пояснюється тим, що це середовище має основні ростові фактори для МКБ, а отже є оптимальним для накопичення достатньої кількості лактобактерій [194; 396].

3.2.7 . Адгезивна активність МКБ

Ще одним важливим критерієм при відборі пробіотичних штамів МКБ є їх здатність швидко колонізувати кишківник. Передумовою такої колонізації є адгезивні властивості бактерій, завдяки яким МКБ прикріпляються до поверхні епітелію, що запобігає їх елімінації під дією кишкової перистальтики та забезпечує домінування в цій екосистемі.

Молекулярні механізми, що забезпечують адгезію МКБ до клітин епітелію, нині повністю не вивчені. Можна припустити, що адгезія специфічна і залежить від рецепторів конкретного штаму та рецепторів клітин епітелію певного макроорганізму.

Враховуючи вищезазначене, для корекції балансу кишкової мікробіоти тварин доцільно використовувати бактерії, виділені від тварин того ж виду. Тому наступним етапом наших досліджень було встановлення адгезивної активності досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* (рис. 3.6).

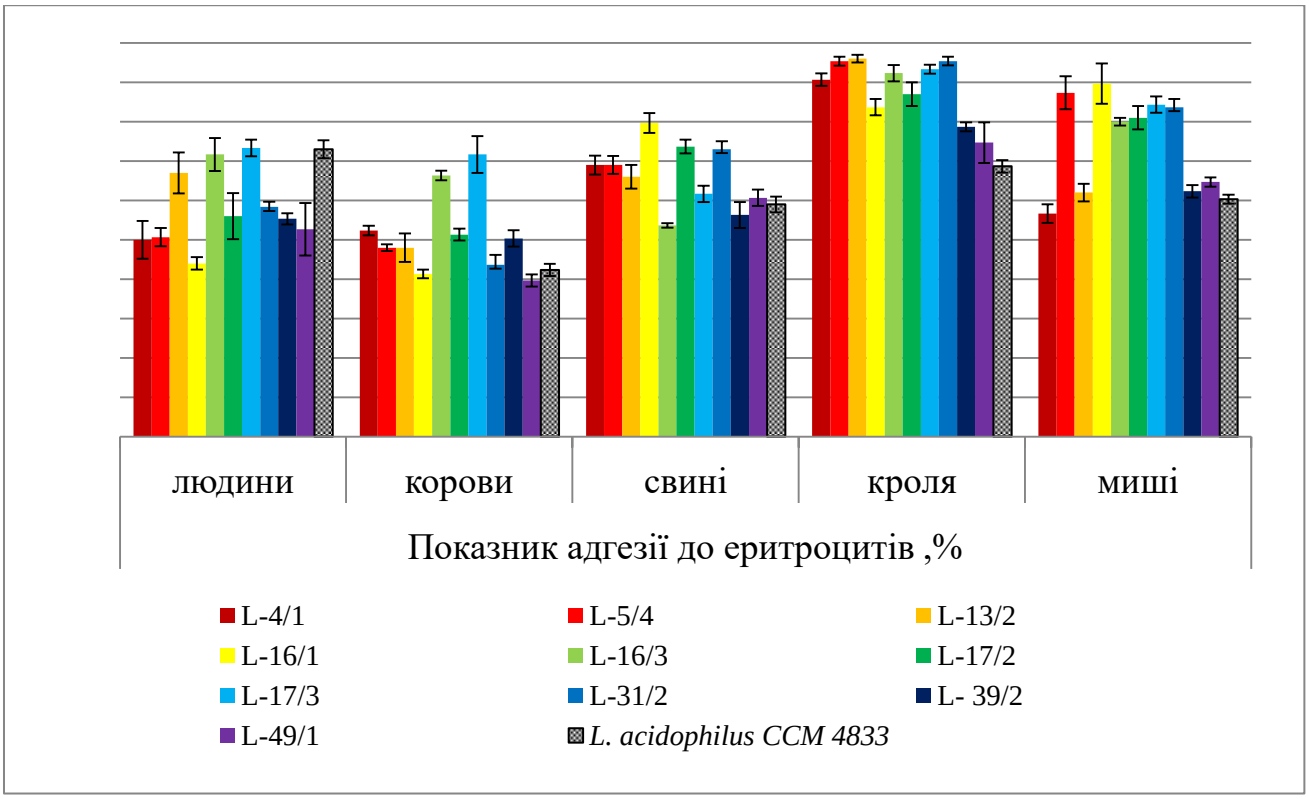


Рис. 3.6. **Адгезивна активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів, до еритроцитів крові людини та тварин (M ± m, n = 3).**

Встановлено, що досліджувані ізоляти проявляли найвищий рівень адгезії до еритроцитів кроля, що в середньому становив 83 %. Рівень адгезії до еритроцитів миші, свині, людини становив, відповідно, 75, 66, 58 %. Найнижчий рівень адгезії (51 %) нами був відмічений до еритроцитів крові ВРХ.

Отже, найвищий показник адгезії досліджувані бактерії проявляли до еритроцитів крові кролів. Одержані нами результати підтверджують гіпотезу, що для кожного виду тварин потрібно використовувати пробіотичний препарат, розроблений на основі представників облігатної мікробіоти шлунково-кишкового каналу конкретного виду тварин, для забезпечення максимального ефекту при його використанні.

Одержані результати свідчать, що відповідно до основних критеріїв відбору, викладених у FAO/WHO guidelines for evaluation of probiotics in food [201], ізолят L-13/2 може бути рекомендований для створення пробіотичних препаратів для кролів.

3.2.8. Стійкість МКБ до метаболітів травної системи

Як вказано в розділі 1, у ветеринарній медицині пробіотичні препарати використовують для мікробної корекції кишківника після антибіотико- та хіміотерапії, для стимулювання неспецифічного імунітету, профілактики та лікування шлунково-кишкових інфекцій тварин.

Однак на практиці далеко не всі пробіотичні препарати виявляються результативними. Причинами недостатньої ефективності пробіотичних мікроорганізмів, що входять до складу більшості препаратів, є їх слабка стійкість до впливу травних соків та жовчі макроорганізму, як наслідок, нестабільність прояву пробіотичної активності [307]. Тому створення нових ефективних пробіотиків на основі цілеспрямовано відібраних штамів пробіотичних мікроорганізмів, стійких до метаболітів травної системи організму-господаря є актуальним завданням.

Нашими подальшими дослідженнями було встановлення граничних значень pH та дослідження впливу гідроген хлориду, жовчі, натрій хлориду та фенолу на активність росту МКБ, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів.

Результати показали, що стійкість до низьких pH є специфічною для ізолятів ознакою. Всі досліджувані ізоляти МКБ не росли на середовищі MRS при значені pH≤3 та pH≥10, дані представлено в таблиці 3.10. Вісім досліджуваних ізолятів були резистентні до pH 4,0. Чисельність мікроорганізмів через дві доби культивування була в межах від 10^3 до 10^9 КУО/мл. За результатами експерименту встановлено оптимальне для росту всіх досліджуваних культур МКБ значення pH середовища — 5-7.

Таблиця 3.10

Вплив значень pH середовища на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Досліджувані ізоляти	pH середовища					
	4	5	6	7	8	9
L-4/1	-	$(2,25±0,41)×10^7$	$(5,3±0,39)×10^9$	$(2,0±0,35)×10^8$	$(4,4±0,65)×10^6$	$(3,2±0,24)×10^4$
L-5/4	-	$(1,4±0,16)×10^8$	$(4,4±0,65)×10^9$	$(6,25±0,56)×10^8$	$(5,3±0,39)×10^5$	$(2,95±0,29)×10^3$
L-13/2	$(2,4±0,31)×10^3$	$(2,95±0,29)×10^8$	$(4,4±0,23)×10^9$	$(2,8±0,25)×10^7$	$(2,6±0,12)×10^5$	$(6,25±0,56)×10^3$
L-16/1	-	$(2,95±0,29)×10^8$	$(5,3±0,39)×10^9$	$(2,5±0,32)×10^8$	$(4,8±0,74)×10^6$	$(2,95±0,26)×10^3$
L-16/3	$(4,4±0,35)×10^3$	$(2,05±0,08)×10^8$	$(2,0±0,35)×10^9$	$(3,36±0,20)×10^8$	$(2,25±0,41)×10^5$	$(5,4±0,43)×10^3$
L-17/2	$(2,25±0,41)×10^3$	$(2,5±0,30)×10^8$	$(1,8±0,27)×10^9$	$(2,6±0,12)×10^8$	$(3,2±0,24)×10^6$	$(3,30±0,34)×10^3$
L-17/3	$(3,45±0,31)×10^3$	$(6,5±0,58)×10^7$	$(8,4±0,67)×10^9$	$(2,95±0,29)×10^8$	$(6,25±0,56)×10^5$	$(3,15±0,27)×10^3$
L-31/2	$(5,8±0,55)×10^3$	$(3,4±0,3)×10^7$	$(9,4±0,85)×10^9$	$(5,4±0,39)×10^8$	$(4,05±0,38)×10^6$	$(4,8±0,45)×10^3$
L- 39/2	$(4,8±0,74)×10^3$	$(4,7±0,43)×10^6$	$(2,95±0,28)×10^8$	$(1,9±0,36)×10^7$	$(2,95±0,29)×10^4$	$(7,4±0,23)×10^3$
L-49/1	$(2,5±0,32)×10^3$	$(3,36±0,20)×10^6$	$(2,25±0,41)×10^8$	$(5,4±0,27)×10^7$	$(2,4±0,31)×10^4$	$(4,4±0,65)×10^3$
L. acidophilus CCM 4833	$(3,2±0,24)×10^3$	$(6,25±0,56)×10^8$	$(4,4±0,65)×10^9$	$(5,3±0,39)×10^8$	$(4,7±0,43)×10^6$	$(4,8±0,45)×10^3$

Стійкість МКБ до NaCl показана в таблиці 3.11. При внесенні до складу середовища 1–3 % натрію хлориду, активність росту досліджуваних ізолятів суттєво не знижувалась і становила 10^8–10^9 КУО/мл після 48 год культивування. Зі збільшенням вмісту солі до 4-5 % ізоляти L-17/2, L-17/3, L-39/2, L-49/1, *L. acidophilus* CCM 4833 накопичувалися у меншій кількості у порівнянні з іншими досліджуваними штамами. Решта досліджуваних ізолятів зберігали активність росту, що складала 10^6 КУО/мл при концентрації 5 % NaCl. Збільшення масової частки натрію хлориду від 3 до 5 % у середовищі призвела до часткового послаблення розвитку і накопичення МКБ.

Відомо, що соляна кислота є серйозною перешкодою для проникнення мікроорганізмів до товстого відділу кишківника макроорганізму. Однак деякі МКБ, особливо, що ізольовані з більш кислих середовищ, успішно долають несприятливі умови і заселяються в товстому відділі кишківника організму

господаря. Варто зазначити, що у здорових кролів шлунок має відносно високу кислотність, у порівнянні з людиною та іншими тваринами, що становить: загальна кислотність 0,36 %, вільної HCl 0,13-0,24 %.

Таблиця 3.11

Вплив NaCl на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Досліджувані ізоляти	Масова частка NaCl					Контроль (безNaCl)
	1%	2%	3%	4%	5%	
L-4/1	$(3\pm1,1)\times10^9$	$(0,94\pm0,043)\times10^9$	$(4,85\pm0,33)\times10^8$	$(9,79\pm0,51)\times10^7$	$(1,75\pm0,36)\times10^6$	$(8,2\pm0,88)\times10^9$
L-5/4	$(1,3\pm0,14)\times10^9$	$(2,7\pm0,127)\times10^9$	$(9,2\pm0,52)\times10^8$	$(1,9\pm0,36)\times10^7$	$(7,4\pm0,23)\times10^6$	$(9,2\pm0,52)\times10^8$
L-13/2	$(7,4\pm0,23)\times10^9$	$(8,4\pm0,23)\times10^9$	$(5,3\pm0,39)\times10^9$	$(4,35\pm0,40)\times10^8$	$(3,2\pm0,24)\times10^6$	$(7,4\pm0,35)\times10^9$
L-16/1	$(8,1\pm0,20)\times10^9$	$(6,18\pm1,88)\times10^9$	$(4,8\pm0,74)\times10^8$	$(2,45\pm1,3)\times10^7$	$(2,5\pm0,32)\times10^6$	$(8,95\pm0,41)\times10^9$
L-16/3	$(3,5\pm0,17)\times10^9$	$(3,15\pm0,27)\times10^9$	$(2,95\pm0,29)\times10^8$	$(4,7\pm0,43)\times10^7$	$(2,25\pm0,41)\times10^6$	$(7,35\pm0,41)\times10^9$
L-17/2	$(3,36\pm0,20)\times10^9$	$(2,0\pm0,35)\times10^9$	$(5,3\pm0,39)\times10^8$	$(2,35\pm0,22)\times10^6$	$(7,3\pm0,52)\times10^4$	$(8,75\pm0,61)\times10^9$
L-17/3	$(8,3\pm0,27)\times10^9$	$(4,7\pm0,43)\times10^9$	$(1,35\pm0,24)\times10^8$	$(5,1\pm0,46)\times10^6$	$(4,70\pm0,42)\times10^4$	$(9,05\pm0,31)\times10^9$
L-31/2	$(6,9\pm0,2)\times10^9$	$(2,35\pm0,22)\times10^9$	$(4,05\pm0,38)\times10^9$	$(4,70\pm042)\times10^8$	$(3,8\pm1,2)\times10^6$	$(8,35\pm0,2)\times10^9$
L- 39/2	$(2,6\pm0,12)\times10^9$	$(4,95\pm0,41)\times10^9$	$(3,30\pm0,34)\times10^8$	$(3\pm1,1)\times10^6$	$(4,4\pm0,65)\times10^4$	$(8,0\pm0,17)\times10^9$
L-49/1	$(4,1\pm0,17)\times10^9$	$(4,8\pm0,45)\times10^9$	$(8,35\pm0,68)\times10^8$	$(6,25\pm0,56)\times10^7$	$(4,8\pm0,74)\times10^4$	$(6,75\pm0,31)\times10^9$
L. acidophilusCCM 4833	$(5,8\pm0,21)\times10^9$	$(2,25\pm0,36)\times10^9$	$(1,35\pm0,24)\times10^8$	$(4,15\pm0,36)\times10^6$	$(2,2\pm0,31)\times10^4$	$(6,9\pm0,21)\times10^9$

Встановлено, що після 48 годин інкубації на середовищі MRS з 1 % соляної кислоти найбільш стійкими виявилися два досліджувані ізоляти L-4/1 та L-13/2, що накопичувались в кількості 10^8 КУО/мл. Решта ізолятів були менш резистентними до гідрогену хлориду, дані представлені в таблиці 3.12. При культивуванні досліджуваних штамів МКБ на середовищі, що містило 3 % соляної кислоти, активність росту значно знижувалася і становила 10^3–10^5 КУО/мл після 48 год культивування.

Таблиця 3.12

Вплив HCl на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Досліджувані ізоляти	Масова частка HCl		Контроль (без HCl)
	1 %	3 %	
L-4/1	$(2,3\pm0,3)\times10^8$	$(3,0\pm0,3)\times10^5$	$(8,2\pm0,88)\times10^9$
L-5/4	$(3,04\pm0,42)\times10^7$	$(5,3\pm0,46)\times10^3$	$(9,2\pm0,52)\times10^8$
L-13/2	$(2,4\pm0,31)\times10^8$	$(4,05\pm0,38)\times10^5$	$(7,4\pm0,35)\times10^9$
L-16/1	$(2,95\pm0,26)\times10^7$	$(2,7\pm0,27)\times10^4$	$(8,95\pm0,41)\times10^9$
L-16/3	$(3,2\pm0,24)\times10^6$	$(3,0\pm1,33)\times10^3$	$(7,35\pm0,41)\times10^9$
L-17/2	$(7,3\pm0,52)\times10^6$	$(2,7\pm0,27)\times10^3$	$(8,75\pm0,61)\times10^9$
L-17/3	$(2,4\pm0,38)\times10^6$	$(2,7\pm0,27)\times10^3$	$(9,05\pm0,31)\times10^9$
L-31/2	$(5,3\pm0,39)\times10^7$	$(8,4\pm0,23)\times10^4$	$(8,35\pm0,2)\times10^9$
L- 39/2	$(4,85\pm0,33)\times10^7$	$(1,35\pm0,24)\times10^4$	$(8,0\pm0,17)\times10^9$
L-49/1	$(2,35\pm0,22)\times10^7$	$(8,4\pm0,23)\times10^4$	$(6,75\pm0,31)\times10^9$
L. acidophilus CCM 4833	$(3,9\pm0,45)\times10^7$	$(2,85\pm0,29)\times10^4$	$(6,9\pm0,21)\times10^9$

Встановлено, що шість ізолятів, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів, проявили толерантність до соляної кислоти більшою мірою, у порівнянні з типовим представником молочнокислих бактерій. Також, варто зазначити, що ріст досліджуваних бактерій був відсутній при додаванні в живильне середовище 4 % соляної кислоти.

Наступним етапом наших досліджень було встановлення стійкості МКБ до жовчі. Толерантність до цього метаболіту травної системи є необхідною умовою для колонізації та метаболічної активності бактерій у кишківнику господаря, оскільки відомо, що клітинні мембрани є дуже чутливими до жовчних кислот [90]. Ця ознака сприяє МКБ досягти тонкого та товстого відділу кишківника та підтримувати баланс його мікробіоти.

Після 48 годин інкубації на середовищі MRS з 20 % жовчі п’яти досліджуваних ізолятів: L-4/1,L-13/2, L-16/3, L-31/2, L-49/1 та типового представника *L. acidophilus* CCM 4833 визначено, що коефіцієнт життєздатності становить щонайменше 10^9 КУО/мл та п’ять ізолятів: L-5/4, L-16/1,L-17/2, L-17/3, L-39/2 – 10^8 КУО/мл (табл. 3.13).

Однакову толерантність до вищої концентрації жовчі (40 %) спостерігали в усіх досліджених ізолятів. Життєздатність через 48 годин після культивування складала 10^8 КУО/мл (табл. 3.13).

Такі показники стійкості даних пробіотичних бактерій можна пояснити тим, що наявність жовчних кислот для них є природним, оскільки джерело їх виділення - шлунково-кишковий канал кролів.

Всі досліджувані бактерії, а також типовий представник молочнокислих бактерій були стійкими до фенолу. Життєздатність через 48 годин після культивування на середовищі, що містило 0,5 % фенолу складала 10^8 КУО/мл (табл. 3.13). Визначення толерантності МКБ до фенолу (0,4-0,5 %) є важливим, бо лише стійкі форми пробіотичних мікроорганізмів здатні приживатися у шлунково-кишковому каналі макроорганізму.

Таблиця 3.13

Вплив жовчі та фенолу на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Досліджувані ізоляти	Масова частка жовчі		Масова частка фенолу 0,5%	Контроль (без жовчі та фенолу)
	20%	40%		
L-4/1	$(4,35±0,40)×10^9$	$(2,0±0,35)×10^8$	$(3,36±0,20)×10^8$	$(8,2±0,88)×10^9$
L-5/4	$(5,3±0,39)×10^8$	$(1,30±0,14)×10^8$	$(3±1,1)×10^8$	$(9,2±0,52)×10^8$
L-13/2	$(9,79±0,51)×10^9$	$(1,35±0,24)×10^8$	$(7,4±0,23)×10^8$	$(7,4±0,35)×10^9$
L-16/1	$(9,2±0,52)×10^8$	$(1,9±0,36)×10^8$	$(7,4±0,23)×10^8$	$(8,95±0,41)×10^9$
L-16/3	$(7,4±0,23)×10^9$	$(2,5±0,32)×10^8$	$(4,8±0,45)×10^8$	$(7,35±0,41)×10^9$
L-17/2	$(6,18±1,88)×10^8$	$(2,0±0,35)×10^8$	$(1,9±0,36)×10^8$	$(8,75±0,61)×10^9$
L-17/3	$(1,2±0,25)×10^8$	$(4,8±0,74)×10^8$	$(3,15±0,27)×10^8$	$(9,05±0,31)×10^9$
L-31/2	$(3±1,1)×10^9$	$(4,1±0,17)×10^8$	$(2,35±0,22)×10^8$	$(8,35±0,2)×10^9$
L- 39/2	$(2,2±,29)×10^8$	$(3,45±0,24)×10^8$	$(1,35±0,24)×10^8$	$(8,0±0,17)×10^9$
L-49/1	$(7,3±0,62)×10^9$	$(6,9±0,2)×10^8$	$(4,70±042)×10^8$	$(6,75±0,31)×10^9$
L. acidophilus CCM 4833	$(1,8±0,28)×10^9$	$(3,45±0,24)×10^8$	$(3,05±0,28)×10^8$	$(6,9±0,21)×10^9$

Таким чином досліджувані МКБ проявили високу стійкість до низьких значень pH та високих концентрацій жовчі, натрію хлориду, гідрогену хлориду та фенолу. Стійкість до основних метаболітів травної системи досліджуваних бактерій збільшить їх можливість колонізувати товстий відділ кишківника макроорганізму за перорального ведення.

Встановлено, що досліджувані штами молочнокислих бактерій, ізольовані з травної системи кролів, мають високий промисловий потенціал та можуть бути використані у виробництві пробіотичних препаратів.

3.2.9. Антибіотикорезистентність МКБ

Як зазначалось вище, використання антибіотиків для стимулювання росту продуктивних тварин несе найбільшу загрозу для гуманної медицини саме через поширення резистентних штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Найкраща альтернатива застосуванню антибіотиків стимуляторів росту у тваринництві – це загальне поліпшення годівлі та умов утримання тварин, використання пробіотиків.

При селекції штамів пробіотичних мікроорганізмів важливе значення має дослідження їх стійкості до антибіотиків, оскільки, на думку деяких дослідників, МКБ можуть бути здатні до горизонтального перенесення генів антибіотикорезистентності до інших мікроорганізмів [22, 137].

Разом з тим, у літературі існують відомості про те, що МКБ не містять плазмідної ДНК, небезпечної для поширення резистентності до антибіотиків серед інших бактерій, скільки плазміди МКБ характеризуються низькою молекулярною масою (менше ніж 10 МД) і не здатні до самостійного перенесення [405], що робить можливим їх лікувально-профілактичне використання навіть з наявною антибіотикорезистентністю [113, 243].

Враховуючи вищезазначене, було досліджено *in vitro* активність антибіотиків щодо перспективних для створення пробіотичного препарату штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з ШКК кролів. Проведено дослідження з визначення мінімальної інгібуючої концентрації за найменшою кількістю антибіотика, що повністю затримувала ріст мікроорганізмів у живильному середовищі MRS. Результати представлено у табл. 3.14. Відповідно до наказу МОЗ України за №167 від 05.04.2007 р «Про затвердження методичних вказівок визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів», встановлено, що досліджувані ізоляти бактерій не перевищували допустимі діапазони значень МІК (мг/л) контрольних штамів мікроорганізмів зі складними поживними потребами [295].

Таблиця 3.14

Мінімальна інгібуюча концентрація антибіотика, µg /см3 (n=3)

Досліджувані ізоляти	**Ампіцилін** (інгібітор трансепти-дази, руйнує клітинну стінку)	**Бензилпеніцилін** (інгібітор синтезу пептидо-глікана, руйнує клітинну стінку)	**Еритроміцин** (інгібує синтез білків)	**Тетрацикліи** (інгібує синтез білків)	**Стрептоміцин** (інгібує синтез білків)
L-4/1	2,50-5,00	0,05-0,50	1,00-2,50	1,00-5,00	2,50-5,00
L-5/4	5,00-7,50	0,10-0,50	0,10-0,50	0,50-2,50	5,00-7,50
L-13/2	5,00-7,50	0,01-0,05	0,50-1,00	0,50-2,50	5,00-7,50
L-16/1	7,50-10,00	0,01-0,05	0,10-0,50	1,00-2,50	2,50-5,00
L-16/3	7,50-10,00	0,10-0,50	0,50-1,00	5,00-7,50	2,50-5,00
L-17/2	7,50-10,00	0,005-0,010	0,50-2,50	5,00-7,50	5,00-7,50
L-17/3	1,00-2,50	≤0,005	0,10-0,50	5,00-,.50	0,50-1,00
L-31/2	5,00-7,50	0,10-0,50	0,10-0,50	0,50-2,50	2,50-5,00
L-39/2	5,00-7,50	0,01-0,05	0,50-1,00	5,00-7,50	5,00-7,50
L-49/1	5,00-7,50	0,10-0,50	0,10-0,50	0,50-2,50	2,50-5,00
L. acidophilus CCM 4833	5,00-7,50	0,01-0,05	0,50-1,00	0,50-2,50	5,00-7,50

Як свідчать результати проведеної роботи, найменше значення показника МІК встановлено для бензилпеніциліну – 0.01 – 0.50 µg /см3, залежно від досліджуваного ізоляту. Найвищі рівні МІК отримано для стрептоміцину та ампіциліну – 2,50 – 10,00 µg /см3. Загалом чутливість досліджуваних ізолятів до антибіотиків мала штамову залежність. Найбільш чутливим до антибіотиків виявився ізолят L-17/3. Значення МІК для всіх антибіотиків використаних у роботі, окрім тетрацикліну, у цього штаму було нижче у порівнянні з іншими досліджуваними бактеріями. Варто зазначити, що МІК для тетрацикліну суттєво

не відрізнялось у всіх досліджуваних ізолятів. Найвищі значення МІК виявлено в ізолятів: L-4/1 – до еритроміцину, L-16/1, L-16/3 та L-17/2 – до ампіциліну.

При вивченні антибіотикорезистентності дисково-дифузним методом ізолят *Lactobacillus sp.* 13/2 виявився стійким до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти (табл. 3.15.).

Таблиця 3.15

Антибіотикорезистентність *Lactobacillus sp.* 13/2.

Клас антибіотиків	Антибіотик	Концентрація в диску, мкг	Чутливість досліджуваного ізоляту
Інгібітори синтезу клітинної стінки			
β-лактамази	Амоксицилін	10	Ч
	Ампіцилін	10	Ч
	Оксацилін	1	С
Цефалоспорини	Цефалексин	30	Ч
Інгібітори синтезу протеїнів			
Аміноглікозиди	Гентаміцин	10	П
	Канаміцин	30	С
	Стрептоміцин	10	С
Макроліди	Еритроміцин	10	Ч
Нітрофурани	Нітрофурантоїн	300U	Ч
Тетрацикліни	Тетрациклін	10	Ч
Хлорамфеніколи	Левоміцетин	30	Ч
Інгібітори синтезу нуклеїнових кислот			
Рифампіцини	Рифампіцин	5	Ч
Хінони	Налідиксова кислота	30	С
	Ципрофлоксацин	5	П
Інгібітори функцій ЦПМ			
Поліміксини	Поліміксин-Б	300U	П

Встановлено низькі значення МІК до ампіциліну, бензилпеніциліну, еритроміцину, тетрацикліну та стрептоміцину для ізолятів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі ШКК кролів. Виявлено стійкість до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти перспективного ізоляту *Lactobacillus sp.* 13/2. Таким чином, отримані результати показали полірезистентність досліджених ізолятів до антибіотиків На нашу думку,

стійкість відібраних нами ізолятів до антибіотиків потребує більш детального вивчення природи даного явища для виключення можливості горизонтального перенесення генів резистентності та підтвердження безпечності їх застосування щодо поширення резистентності до антибіотиків серед інших бактерій.

3.2.10. Ідентифікація досліджуваних ізолятів

3.2.10.1. Фізіолого-біохімічні властивості бактерій роду *Lactobacillus*

Досліджувані ізоляти не утворювали фермент каталазу та не відновлювали нітрати до нітритів. В агаризованому середовищі MRS вони утворювали колонії білого кольору 1,0–2,0 мм у діаметрі у вигляді «човників» або дисків. На рідких живильних середовищах бактерії росли у вигляді рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні, були факультативними анаеробами. У процесі дослідження встановлено, що загалом температурний діапазон росту виділених ізолятів становив від +15 °С до +45 °С, а оптимальна температура їх розвитку – (37±2) °С. За фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками досліджувані ізоляти МКБ були віднесені до бактерій роду *Lactobacillus*.

Подальшу ідентифікацію проводили 10 найбільш перспективних ізолятів, що були відібрані в попередніх дослідженнях [370, 371]. До затвердження філогенетичного підходу (заснованого на послідовності 16S рРНК) основний спосіб систематики роду *Lactobacillus* базувався за типом зброджування цукрів [158]. Враховувалася морфологія клітин, температурний інтервал росту (ріст при 15 ^{o}С і 45 ^{o}С), деякі харчові потреби. На підставі цих ознак розрізняли три фізіологічні групи: облігатно гомоферментативні молочнокислі бактерії (*Thermobacterium*), факультативно гетероферментативні (*Streptobacterium*), облігатно гетероферментативні (*Betabacterium*).

До облігатно-гетероферментативних були віднесені 5 ізолятів, які росли при 45 ^{o}С та не росли при 15 ^{o}С, не зброджували рибозу, не утворювали газ з глюкози (табл. 3.16). Решта ізолятів не розвивалися при температурі 45 ^{o}С, однак росли при 15 ^{o}С, зброджували рибозу та утворювали газ з глюкози і продукували

альдолазу, тому їх віднесено до факультативно гетероферментативних молочнокислих бактерій. Ізоляти не проявляли нітратредуктазної активності. У всіх досліджуваних ізолятів виявлено фермент альдолазу, тому ми жодного з них не відносимо до облігатно гетероферментативних.

Таблиці 3.16.

Фізіолого-біохімічні властивості ізолятів *Lactobacillus*

	облігатно гомоферментативні	факультативно гетероферментативні	облігатно гетероферментативні
Ріст при температурі 45°С	+	-	±
Ріст при температурі 15°С	-	+	+
Зброджування рибози	-	+	+
Утворення газу з глюкози	-	+	+
Альдолаза	+	+	-
Досліджувані ізоляти	L-4/1, L-13/2, L-31/2, L-39/2, L-49/1	L-5/4, L-16/1, L-16/3, L-17/2, L-17/3	

Примітка: + позитивний результат; – негативний результат.

3.2.10.2. Видова ідентифікація бактерій роду *Lactobacillu*s за спектром фізіолого-біохімічних властивостей

Наступним етапом нашої роботи було проведення попередньої ідентифікації досліджуваних ізолятів до виду за біохімічними властивостями. Класифікація, створена на підставі вивчення біохімічних властивостей залишається актуальною і на сьогодні [53, 194]. Важливим для визначення видової приналежності МКБ є вивчення здатності використовувати речовини як єдине джерело вуглецевого живлення (табл. 3.17). Встановлено, що 40 % досліджуваних ізолятів молочнокислих бактерій, здатні ферментувати арабінозу, дульцит; 50 % – маніт; 70 % – сорбіт; 80 % – манозу, фруктозу; 90 % – лактозу; 100 % – галактозу, мальтозу, сахаразу, глюкозу 20 % – рафінозу. Жоден досліджуваний ізолят МКБ не використовував рамнозу та ксилозу, як едине джерело Карбону.

Таблиця 3.17

Використання досліджуваними ізолятами хімічних речовин як єдиного джерела вуглецю

	Арабіноза	Галактоза	Дульцит	Лактоза	Мальтоза	Маніт	Маннoза	Рамноза	Рафіноза	Сахароза	Сорбіт	Фруктоза	Глюкоза	Ксилоза	Філогенетична група
L-4/1	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	*L.Lactis*
L-5/4	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	*L. casei*
L-13/2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	*L. acidophilus*
L-16/1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	*L. plantarum*
L-16/3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	*L. plantarum*
L-17/2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	*L. plantarum*
L-17/3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	*L. plantarum*
L-31/2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	*L. acidophilus*
L-39/2	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	*L.Lactis*
L-49/1	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	*L. acidophilus*

Примітка: + позитивний результат;- негативний результат.

Відповідно до отриманих результатів, нами попередньо ідентифіковано 10 ізолятів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів до філогенетичних груп: L-13/2, L-31/2, L-49/1 – *L. acidophilus*, L-4/1, L-39/2 – *L.lactis*, L-5/4 – *L. casei*, L-16/1, L-16/3, L-17/2, L-17/3 – *L. plantarum*.

Варто зазначити, що філогенетична група *Lactobacillus acidophilus* об’єднує ряд видів: *L. delbrueckii, L. acidophilus, L. helveticus*, які є найбільш промислово значущими і на сьогодні широко використовуються в харчовій та фармацевтичній промисловості [139, 180].

3.2.10.3. Молекулярно-генетична ідентифікація штаму L-13/2

З даних літератури відомо, що використання фенотипових ознак не дає змоги чітко провести видову ідентифікацію МКБ [170]. Тому останніми роками все більш загальновживаною стає ідентифікація мікроорганізмів із використанням генетично-молекулярних методів. З появою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стала можливою розробка різних варіантів праймерів для визначення багатьох видів роду *Lactobacillus* на основі будови генів рибосомної РНК. Внаслідок детального аналізу гену 16S-рРНК і 16S-23S спейсерної ділянки було виявлено специфічні відмінності, характерні для різних таксономічних рівнів МКБ: роду, виду, підвиду і штаму. Даний факт був використаний для конструювання видо- і групоспецефічних праймерів для визначення й ідентифікації цих мікроорганізмів. Так, Tilsala-Timisjärvi A. та Alatossava T.[263], Fortina M. G., Ricci G., Mora D., Parini C., та Manachini P. L. розробили праймери для визначення видів *L. acidophilus* та *L. helveticus.* [246].

Вивчення пробіотичних властивостей бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів, показало, що найбільш перспективним для створення пробіотику для кролів є ізолят *Lactobacillus sp.* 13/2 [371]. Тому для молекулярно-генетичних досліджень з використанням видоспецифічиних праймерів було обрано саме цей ізолят. У контрольному варіанті позитивний результат отримано для типового представника молочнокислих бактерій, що підтвердило його належність до виду *L. acidophilus* (рис. 3.7.). У дослідному варіанті встановлено, що досліджуваний ізолят *Lactobacillus sp*. 13/2 (L-13/2) не містить фрагментів генів, які наявні у більшості видів *L. acidophilus*, *L. helveticus*. Тому його точна видова ідентифікація потребує залучення додаткових методів.

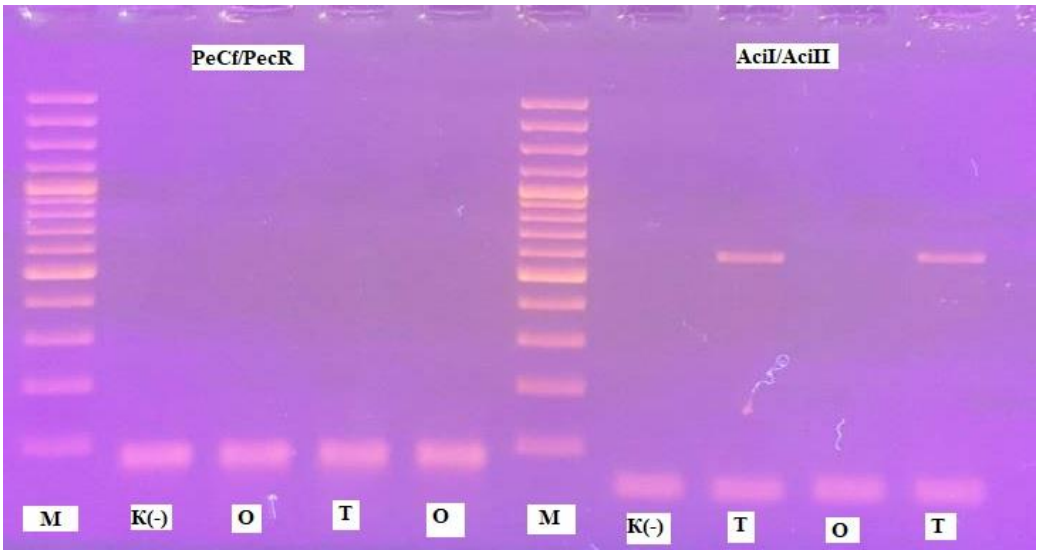


Рис. 3.7. **Електрофоретичний аналіз в 1,5% гелі агарози продуктів ампліфікації з праймерами PeCf/PecR та AciI/AciII.** Варіанти: М - маркер розмірів фрагментів ДНК “100 bp Plus DNA Ladder“ (Thermo Scientific); К(-) – негативний контроль; Т – типовий штам; О - *Lactobacillus sp.* 13/2: Специфічність праймерів до послідовності геномної ДНК бактерій роду *Lactobacillus* показана за допомогою програмного забезпечення “Vector NTI” v.10.0.1 (Invitrogen)(Додаток В).

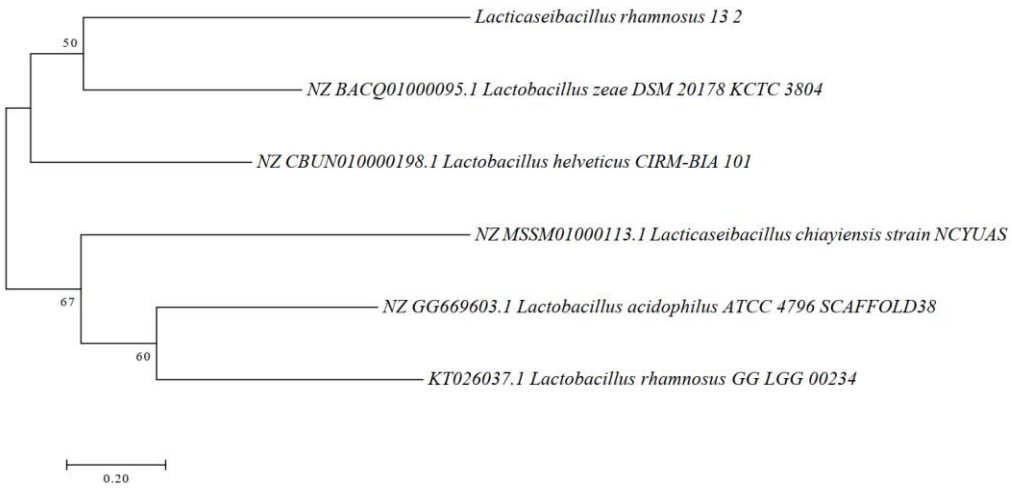
Для визначення більш точного таксономічного положення *Lactobacillus sp.* 13/2 було проведено визначення нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК. У результаті було отримано ДНК-фрагмент (499 пар нуклеотидів). Оцінка ідентичності гену 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp.* 13/2 із депонованими в міжнародній базі даних GenBank наведена в таблиці 3.1.

Таблиця 3.18

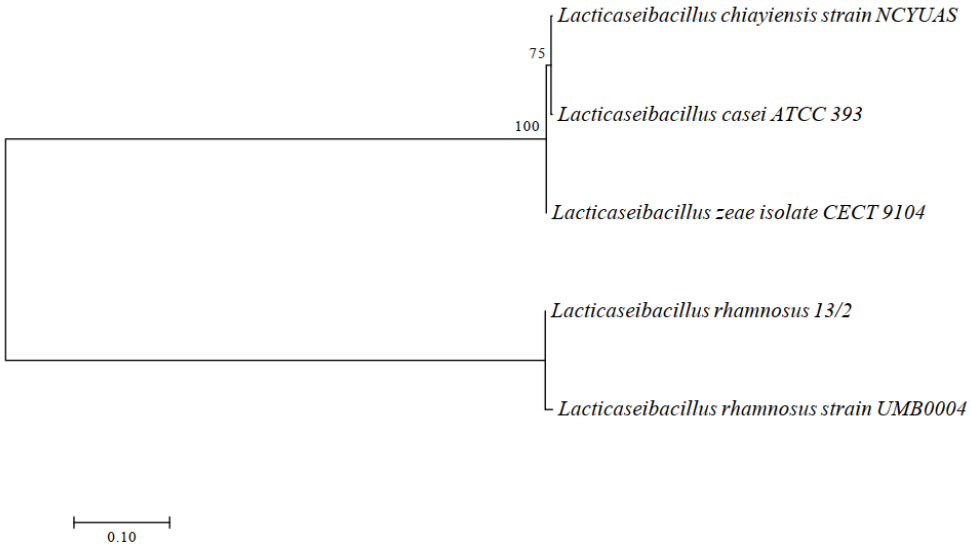
Гомологія нуклеотидних послідовностей фрагмента гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp.* 13/2 і задепонованих у GenBank референтних штамів

Референтні штами задепоновані у GenBank	Ідентичність послідовностей, %
Lacticaseibacillus rhamnosus strain UMB0004	98.49
Lacticaseibacillus zeae isolate CECT 9104	95.91
Lacticaseibacillus chiayiensis strain NCYUAS	95.48
Lacticaseibacillus casei ATCC 393	95.48

Результати філогенетичного аналізу фрагменту гена 16S рРНК, наведені на філогенетичному дереві (рис.3.8). За аналізом нуклеотидної послідовності фрагменту гена 16S рРНК досліджуваний штам відноситься до *Lacticaseibacillus rhamnosus* [6].



а



б

Рис. 3.8. **Філогенетичні дерева:** а – побудоване на основі аналізу фрагментів гену 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp.* 13/2 та близьких за культурально-морфологічними та біохімічними ознаками штамів молочнокислих бактерій; б - побудоване на основі аналізу фрагментів гену 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp.* 13/2 та генетично споріднених штамів молочнокислих бактерій.

З літературних джерел відомо [164], що типовий представник цього виду, штам *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), який є найбільш вивченим серед пробіотичних штамів, за первинною ідентифікацією був віднесений до *L. acidophilus.* Що дозволяє припустити близьку подібність за морфолого-культуральними та біохімічними показниками видів *Lacticaseibacillus rhamnosus* та *L. acidophilus*. Лише з часом коли послідовність геному була розшифрована зміненого його таксономічне положення [56]. Також варто зазначити, що в описі до патенту зазначені аналогічні показники (висока кислотоутворююча та адгезивна активності, стійкість до метаболітів травної системи) з досліджуваним штамом.

Отже, на основі скринінгу серед 250 ізолятів бактерій роду *Lactobacillus* виділених зі ШКК кролів, за комплексом пробіотичних властивостей було відібрано ізолят *Lactobacillus sp*. 13/2 (L-13/2). За результатами поліфазної таксономії встановлено приналежність даного ізоляту до виду *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

3.3. Вплив штаму *L. rhamnosus* 13/2 на макроорганізм

3.3.1. Визначення безпечності штаму *L. rhamnosus* 13/2

Одним з найважливіших етапів розробки безпечних ветеринарних препаратів є їх токсикологічні дослідження. Законодавство України (Закон України «Про ветеринарну медицину») регулює використання кормових добавок, в тому числі й пробіотиків, шляхом впровадження їх реєстрації. Враховуючи те, що при неправильному використанні або передозуванні деякі кормові добавки можуть бути потенційно небезпечними, важливим завданням є гарантування їх безпечності. Варто зазначити, що бактерії роду *Lactobacillus* належать до групи 2 класифікації ВООЗ та ЄС [57] та групи 4 класифікації Міністерства охорони здоров’я України, що діє на даний час [358]. Однак підтвердження безпечності нових пробіотичних препаратів, які вперше

вводяться в обіг, повинні включати дослідження з вивчення безпечності як на лабораторних, так і на цільових тваринах [365].

Базовим параметром оцінки токсичності кормової добавки, на якому ґрунтується планування інших досліджень, є гостра токсичність.

Визначення параметрів гострої токсичності кормових добавок, які вводяться в обіг, передбачено як вимогами законодавства Європейського Союзу [48], так і вітчизняними вимогами [367].

Досліджували вірулентність активних життєздатних клітин штаму *L. rhamnosus 13/2* з використанням лабораторних статевозрілих білих мишей [312].

За час спостереження після введення суспензії живих клітин бактерій (перорально або внутрішньочеревного) всі тварини були активними, добре поїдали корм, фізіологічні випорожнення у них не погіршувалися, поведінкові реакції були звичайними, змін з боку хутрового покриву не виявлено. Клінічні прояви токсикозу не спостерігались. Вірогідна різниця в масі тіла дослідних та контрольних тварин, а також у загальному стані та поведінці була відсутня.

Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин через 15 діб після початку досліду показали, що даний штам не інфекційний, не дисимілює і не розмножується в організмі ссавців.

Пероральне та внутрішньочеревне введення суспензії живих клітин культури не спричиняло інвазії бактерій у внутрішні органи тварин.

Отримані результати свідчать про авірулентність штаму *L. rhamnosus 13/2* для досліджуваних лабораторних тварин ($ЛД_{50в/ч}$ >2×10^9, $ЛД_{50per\ os}$ >36×10^9 клітин/мишу). Не відмічено випадків загибелі мишей при введені суспензії клітин бактерій (табл. 3.18).

Таблиця 3.19

Результати вивчення вірулентності штаму *L. rhamnosus 13/2*

Матеріал для ввеедення	Кількість мишей	Доза		Шлях введення	Курс введення	Кількість мишей		
						Захворіло	загинуло	Вижило
	шт.	мл	млрд. клітин		діб	шт.	шт.	шт.
Дослід								
Суспензія живих 24-годинних клітин штаму *Lactobacillus sp.* 13/2	6	0,5	2	в/ч	1	0	0	6
	6	1	36	*per os*	1	0	0	6
Контроль								
Фізіологічний розчин	6	0,5	2	в/ч	1	0	0	6
	6	1	36	*per os*	1	0	0	6

Примітка: в/ч – внутрішньочеревинні ін’єкції; *per os* – введення в шлунок за допомогою зонду.

По закінченню періоду дослідження як дослідні так і контрольні миші, були виведені з експерименту, було вивчено стан внутрішніх органів. За проведених макроскопічних досліджень внутрішніх органів, не виявлено інфекційних патологій, а також ураження тварин як в дослідній, так і в контрольній групі.

При огляді встановлено, що серце мало звичайну форму та розміри, темно-червоного кольору. Долі легень однорідні, легко відокремлюються одне від одного, поверхні гладенькі, спайки відсутні, в об’ємі не збільшені, на розрізі тканини біло-рожевого кольору. Шлунок, петлі тонкого та товстого кишківника були звичайними ззовні, на розрізі малюнок слизової незмінний. Печінка була представлена долями нормальних розмірів, які покривала незмінена капсула, тканина органу однорідна, еластична коричнювато-червонуватого кольору,

середнього кровонаповнення на розрізі виступали краплі крові. Нирки нормальних розмірів та форми, гладенькі поверхні, на розрізі чіткий малюнок коркової та мозкової частини органу. Селезінка звичайного розміру, тугої консистенції, на розрізі пульпа темного кольору та помірно повнокровна. У всіх контрольних та дослідних тварин за даних умов досліду макроскопічно у внутрішніх органах не виявлено структурних змін, запальної реакції та гемодинамічних порушень.

При аналізі отриманих даних щодо вірулентних властивостей клітин та відповідних нормативних матеріалів було встановлено, що штам *L. rhamnosus 13/2* належить до групи авірулентних мікроорганізмів, що не здатні до інвазії у внутрішні органи лабораторних тварин – білих мишей. За відсутністю вірулентності штами належать до IV класу безпеки мікроорганізмів. Даний штам може бути використаний як кормова добавка до раціону тварин.

3.3.2. Ефективність використання штаму *L. rhamnosus 13/2* для профілактики сальмонельозних інфекцій

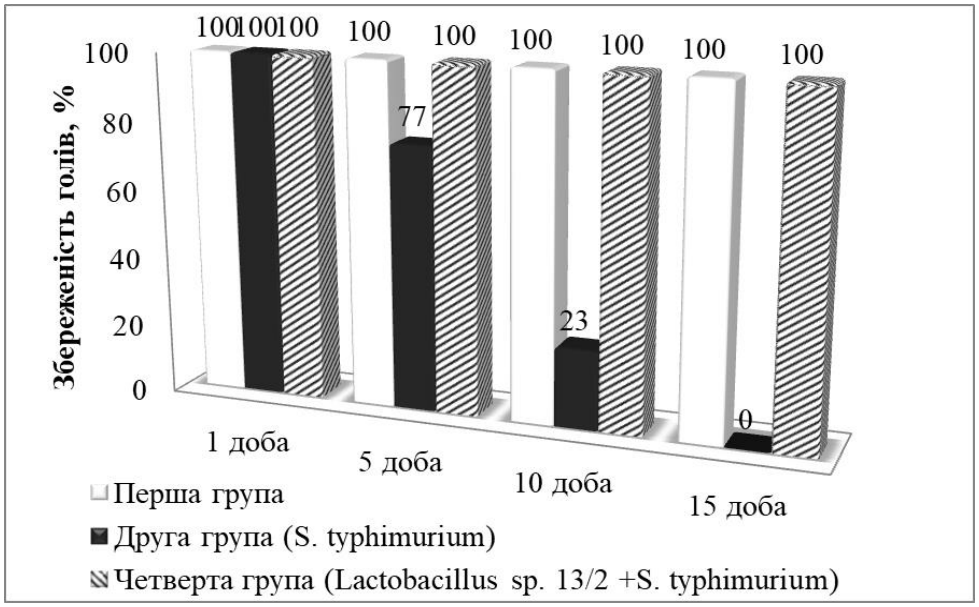
На даний час для лікування та профілактики сальмонельозу застосовують комплексні антибактеріальні препарати. Однак антибіотики і хіміотерапевтичні засоби не завжди ефективні, оскільки сальмонели мають стійкість до багатьох антибіотиків [319]. У зв’язку з цим ВООЗ не рекомендує використовувати антибіотики в боротьбі з цією інфекцією [358].

Поширення сальмонельозоносійства серед людей і тварин, відсутність тенденції до зниження захворюваності у більшості країн світу, збільшення контамінації сальмонелами різних об’єктів зовнішнього середовища спонукають до пошуку нових ефективних засобів боротьби із захворюванням [319].

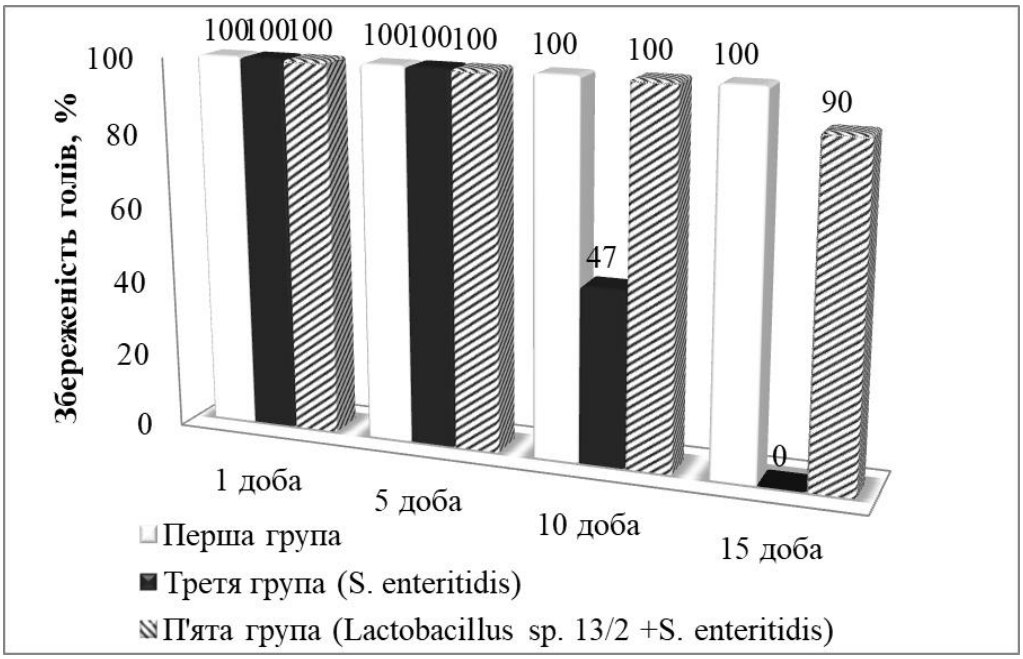
У наших дослідах *in vivo* на лабораторних мишах було вивчено можливість використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 з метою профілактики сальмонельозних інфекцій.

Виявлено позитивний ефект введення молочнокислих бактерій перед інфікуванням збудниками сальмонельозу тварин. Упродовж перших 5 діб спостереження збереженість тварин становила 100 % у всіх групах, окрім другої контрольної, де збереженість знизилася до 77 %. У період з 6-ї по 10-ту добу смертність тварин у другій контрольній групі становила 77 %, а у третій контрольній групі – 53 %. У цей же період спостереження збереженість тварин у четвертій і п’ятій дослідних групах становила 100 %. Загалом, за весь термін спостереження у другій і третій контрольних групах смертність тварин сягала 100 %, а у дослідних групах лише у п’ятій вона становила 10 %. У першій контрольній групі за час експерименту падежу не було.

Встановлено, що використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 дало змогу забезпечити збереженість 100 % дослідних тварин у групі у разі зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і 90 % – у разі *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko* (рис. 3.8).



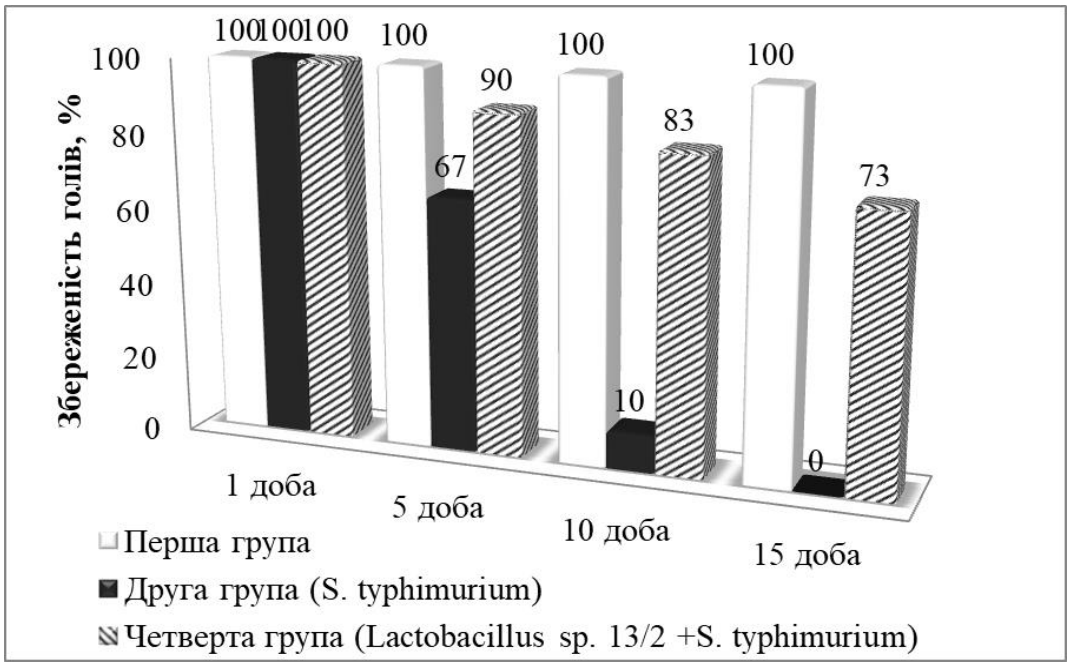
А



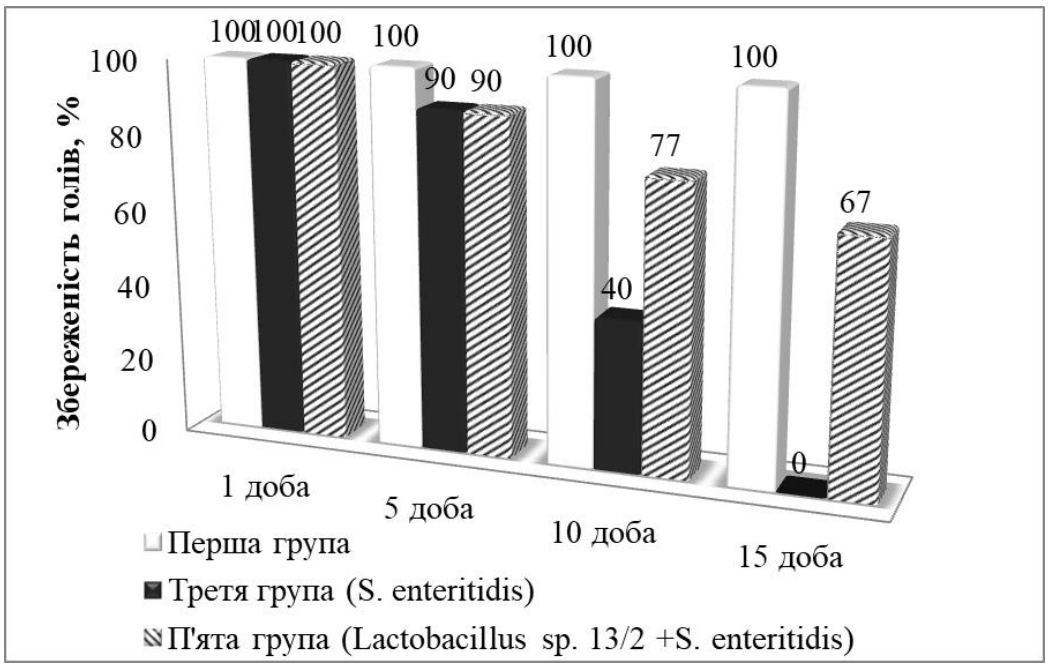
Б

Рис. 3.8. **Ефективність використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 для профілактики сальмонельозних інфекцій перед інфікуванням збудниками сальмонельозу, збереженість голів** (n = 10):А-збудник захворювання *Salmonella typhimurium;* Б- збудник захворювання *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko.*

У дослідах *in vivo* на лабораторних мишах встановлено позитивний ефект застосування штаму *L. rhamnosus* 13/2 після введення збудників сальмонельозу дослідним тваринам (рис. 3.9).



А



Б

Рис. 3.9. **Ефективність використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 для профілактики сальмонельозних інфекцій після інфікування збудниками сальмонельозу, збереженість голів** (n = 10): А-збудник захворювання *Salmonella typhimurium;* Б- збудник захворювання *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko.*

Так, за перші п’ять діб спостереження збереженість тварин зростала тільки у четвертій контрольній групі, у порівнянні з другою контрольною групою. Відмічено, що вже на п’яту добу введення знежиреного молока, ферментованого

L. rhamnosus 13/2, у деяких мишей дослідних груп спостерігали відсутність клінічних ознак захворювання. Проти контролю, суттєво зменшилася смертність тварин у період з 6-ї по 10-ту добу лікування. У четвертій дослідній групі за цей період спостерігали зменшення смертності тварин, у порівнянні з другою контрольною групою. Введення лабораторним тваринам молока, ферментованого досліджуваним штамом молочнокислих бактерій, виявилось ефективним у п’ятій дослідній групі, де смертність зменшилась у 4 рази, проти третьої контрольної групи. У разі введення лабораторним тваринам лише суспензій бактерій роду *Salmonella* в дозі, що містила 1×10^9 КУО, смертність тварин до 15-ї доби становила 100 %. У першій контрольній групі за час експерименту падежу не було.

Отже, введення штаму *L. rhamnosus* 13/2 після інфікування збудниками сальмонельозу лабораторних мишей дало змогу зберегти 73 та 67 % дослідних тварин під час зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko*, відповідно.

Отриманий позитивний ефект застосування бактерій *Lactobacillus sp.* 13/2 для профілактики сальмонельозу в лабораторних тварин, на нашу думку, пояснюється наявністю у досліджуваного штаму молочнокислих бактерій антагоністичної дії до збудників сальмонельозних інфекцій. Крім того, висока адгезивна активність молочнокислих бактерій, імовірно, сприяла колонізації штамом *L. rhamnosus* 13/2 слизової оболонки шлунково-кишкового тракту дослідних тварин. У зв’язку з цим, загалом підвищилася захисна здатність облігатної мікробіоти шлунко-кишкового тракту, що перешкодило колонізації збудників сальмонельозних інфекцій на слизовій оболонці кишківника дослідних тварин.

3.3.3. Відновлення та корекція балансу мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків, за використання штаму *L. rhamnosus* 13/2

Здоров'я тварин залежить від балансу між нормальною і потенційно патогенною мікробіотою кишківника. Будь-які зміни в цій рівновазі супроводжуються функціональними порушеннями, які призводять до зниження продуктивності. Використання пробіотиків дає змогу уникнути дисбалансу кишківника та загибелі молодняку.

Для лікування і профілактики дисбактеріозу в сільськогосподарських тварин дедалі більшої популярності набуває застосування пробіотиків на основі нормальної мікробіоти з використанням перспективних штамів. Метою наших досліджень було відновлення балансу мікрофлори шлунково-кишкового каналу кролів, після антибіотикотерапії, за використання МКБ, відібраних нами в попередніх дослідженнях.

Вже після першого дня експерименту відмічено поліпшення складу кишкової мікрофлори у тварин дослідних груп та другої контрольної групи, що отримувала «Імунобактерин-D» у порівнянні з тваринами, які отримували лише воду (третя група) (табл. 3.20). Вірогідна різниця у чисельності біфідобактерій у шлунково-кишковому каналі спостерігалась у тварин всіх дослідних групах щодо контрольних.

Таблиця 3.20

Склад мікробіоти кишківника молодняку кролів на 1-й день експерименту, КУО/г (M±m, n=8)

Групи бактерій	Контрольні групи тварин			Дослідні групи травин				
	Перша група (Інтактна)	Друга група (Імунобактерин-D)	Третя група (вода)	Четверта група (1 мл/л)	П'ята група (5 мл/л)	Шоста група (10 мл/л)	Сьома група (50 мл/л)	Восьма група (100 мл/л)
Біфідобактерії	$(7,8\pm0,6)\times10^{6}$	$(4,2\pm0,3)\times10^{2}$	$(1,8\pm0,2)\times10^{2}$	$(3,1\pm0,2)\times10^{3abc}$	$(2,8\pm0,6)\times10^{4abc}$	$(4,1\pm0,3)\times10^{6bc}$	$(4,8\pm0,6)\times10^{6bc}$	$(5,8\pm0,2)\times10^{6bc}$
Молочнокислі бактерії	$(7,4\pm0,3)\times10^{8}$	$(3,7\pm0,6)\times10^{4}$	$(4,9\pm0,4)\times10^{3}$	$(1,3\pm0,1)\times10^{4ac}$	$(2,2\pm0,3)\times10^{4ac}$	$(3,2\pm0,6)\times10^{4ac}$	$(3,8\pm0,5)\times10^{5abc}$	$(5,1\pm0,3)\times10^{5abc}$
Загальна кількість кишкової палички	$(8,7\pm0,7)\times10^{5}$	$(4,2\pm0,2)\times10^{5}$	$(1,9\pm0,1)\times10^{2}$	$(3,3\pm0,5)\times10^{3abc}$	$(2,6\pm0,1)\times10^{4abc}$	$(4,3\pm0,2)\times10^{6abc}$	$(4,7\pm0,7)\times10^{6abc}$	$(5,6\pm0,3)\times10^{6abc}$
Кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю,%	82	78	71	78	81	79	83	82
Кишкова паличка зі слабко вираженою ферментативною активністю,%	18	22	29	22	19	21	17	18
Дріжджоподібні гриби	$(9,8\pm1,2)\times10^{3}$	$(6,7\pm0,6)\times10^{4}$	$(2,9\pm0,3)\times10^{5}$	$(3,7\pm0,3)\times10^{3bc}$	$(2,8\pm0,2)\times10^{3bc}$	$(5,2\pm0,6)\times10^{4ac}$	$(1,6\pm0,2)\times10^{4ac}$	$(1,2\pm0,4)\times10^{4ac}$

Примітка: a-достовірна різниця порівняно з першою групою, при значені P≤0,05; b-достовірна різниця порівняно з другою групою, при значені P≤0,05;c-достовірна різниця порівняно з третьою групою, при значені P≤0,05.

Однак різниця в чисельності молочнокислих бактерій, що колонізують шлунково-кишковий тракт дослідних тварин виявилась менш значною. Використання «Імунобактерин-D», сприяло зростанню кількості МКБ у шлунково-кишковому каналі тварин (друга група), вже після одноразового введення у порівнянні з другою контрольною групою. Ми пояснюємо такий результат внаслідок ферментативних речовин (ксиланаза, протеаза, амілаза), що входять до складу препарату, що здатні проявляти пребіотичний ефект та стимулювали ріст облігатної мікрофлори. Відмічено, що введення вищих доз (50 та 100 мл на 1 л питної води) бактеріальної суспензії МКБ сприяло збільшенню чисельності МКБ у сьомій та восьмій дослідних груп, у порівнянні з тваринами другої групи.

Чисельність бактерій групи кишкова паличка вірогідно відрізнялась у всіх дослідних групах тварин у порівнянні з контрольними групами. У тварин другої групи загальна кількість кишкової палички була найближчою до тварин інтактної групи (перша група). У тварин четвертої та п’ятої дослідних груп відмічено, що загальна кількість кишкової палички менша у порівнянні з першою та другою контрольними групами. При введенні високих доз (10 мл та більше на 1 л питної води) бактеріальної суспензії МКБ спостерігалось збільшення загальної кількості кишкової палички у шлунково-кишковому тракті тварин шостої, сьомої та восьмої груп проти тварин першої групи. В усіх групах тварин частка кишкової палички зі слабко вираженою ферментативною активністю становила від 17 до 29 %.

У тварин четвертої та п’ятої дослідних груп встановлено зменшення чисельності дріжджоподібних грибів у шлунково-кишковому каналі у порівнянні з тваринами другої та третьої контрольних груп. Хоча у тварин шостої, сьомої та восьмої груп, які отримували високі дози бактеріальної суспензії (від 10 до 100 мл/л), відмічено збільшення чисельності дріжджоподібних грибів, проти тварин першої контрольної групи. На нашу думку, це пояснюється стійкістю грибів до низьких значень pH та речовин, що володіють протимікробною дією. Однак найбільшу кількість дріжджоподібних

грибів виявлено у тварин третьої контрольної групи, які не отримували жодних речовин або препаратів для відновлення балансу кишкової мікробіоти.

На третю добу експерименту було відмічено збільшення чисельності біфідобактерій у тварин сьомої та восьмої груп стосовно до контрольних. Також суттєво зростала чисельність МКБ у тварин 5,6,7 та 8 груп. А чисельність дріжджоподібних грибів у дослідних групах навпаки зменшувалась (табл. 3.21).

На сьомий день експерименту чисельність біфідобактерій у дослідних групах прийшла в норму. Чисельність МКБ ще була дещо нижчою у дослідних групах, у порівнянні з інтактною, але зростала у порівнянні з другою та третьою контрольними групами. Також суттєво зменшувалась чисельність дріжджоподібних грибів у дослідних тварин, що отримували 10 і більше мл/л води бактеріальної суспензії (табл. 3.22).

На 14-й день експерименту відмічено збільшення біфідобактерій у восьмій дослідній групі. Чисельність МКБ зростала у сьомій та восьмій групі проти інтактної групи. Також зберігалась тенденція до зменшення чисельності дріжджеподібних грибів у дослідних тварин, що отримували 10 і більше мл/л води бактеріальної суспензії (табл. 3.23).

Встановлено позитивний ефект при використанні МКБ при дисбіотичних порушеннях у кролів, викликаних антибіотиками.

Отже, під час застосування досліджуваних молочнокислих бактерій відбувалася корекція мікробіоти кишківника кролів у бік збільшення корисних мікроорганізмів та зменшення умовно-патогенної мікробіоти. Доцільно використовувати даний штам бактерій як основу препарату для нормалізації мікробіоти організму тварин, особливо за умов промислового ведення тваринництва.

Таблиця 3.21

Склад мікробіоти кишківника молодняку кролів на 3-й день експерименту, КУО/г (M±m, n=8)

Групи бактерій	Контрольні групи тварин			Дослідні групи травин				
	Перша група (Інтактна)	Друга група (Імунобактерин-D)	Третя група (вода)	Четверта група (1 мл/л)	П'ята група (5 мл/л)	Шоста група (10 мл/л)	Сьома група (50 мл/л)	Восьма група (100 мл/л)
Біфідобактерії	$(5,1\pm0,4)\times10^{6}$	$(3,1\pm0,1)\times10^{4}$	$(1,2\pm0,1)\times10^{3}$	$(2,4\pm0,4)\times10^{4ac}$	$(1,4\pm0,1)\times10^{5abc}$	$(2,7\pm0,2)\times10^{6abc}$	$(1,3\pm0,2)\times10^{7abc}$	$(2,7\pm0,1)\times10^{7abc}$
Молочнокислі бактерії	$(6,7\pm0,3)\times10^{8}$	$(2,7\pm0,2)\times10^{6}$	$(1,9\pm0,1)\times10^{6}$	$(2,8\pm0,1)\times10^{6ac}$	$(8,7\pm0,6)\times10^{6abc}$	$(4,3\pm0,7)\times10^{6abc}$	$(2,0\pm0,1)\times10^{7abc}$	$(6,4\pm0,4)\times10^{8bc}$
Загальна кількість кишкової палички	$(7,9\pm0,5)\times10^{5}$	$(4,2\pm0,2)\times10^{5}$	$(5,9\pm0,7)\times10^{4}$	$(3,7\pm0,4)\times10^{4abc}$	$(2,7\pm0,3)\times10^{5abc}$	$(1,8\pm0,2)\times10^{6abc}$	$(3,2\pm0,3)\times10^{6abc}$	$(2,3\pm0,3)\times10^{6abc}$
Кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю,%	84	80	79	78	80	82	84	83
Кишкова паличка зі слабко вираженою ферментативною активністю,%	16	20	21	22	20	18	16	17
Дріжджоподібні гриби	$(7,3\pm,0,8)\times10^{3}$	$(1,2\pm0,2)\times10^{5}$	$(4,0\pm0,5)\times10^{5}$	$(2,6\pm0,2)\times10^{3abc}$	$(3,3\pm0,4)\times10^{3abc}$	$(1,8\pm0,2)\times10^{3abc}$	$(2,6\pm0,3)\times10^{3abc}$	$(2,2\pm0,6)\times10^{3abc}$

Примітка: a-достовірна різниця порівняно з першою групою, при значені P≤0,05; b-достовірна різниця порівняно з другою групою, при значені P≤0,05;c-достовірна різниця порівняно з третьою групою, при значені P≤0,05.

Таблиця 3.22

Склад мікробіоти кишківника молодняку кролів на 7-й день експерименту, КУО/г (M±m, n=8)

Групи бактерій	Контрольні групи тварин			Дослідні групи травин				
	Перша група (Інтактна)	Друга група (Імунобактерин-D)	Третя група (вода)	Четверта група (1 мл/л)	П'ята група (5 мл/л)	Шоста група (10 мл/л)	Сьома група (50 мл/л)	Восьма група (100 мл/л)
Біфідобактерії	$(8,3\pm0,6)\times10^{6}$	$(1,3\pm0,1)\times10^{6}$	$(1,8\pm0,2)\times10^{5}$	$(7,7\pm0,9)\times10^{6bc}$	$(7,8\pm0,6)\times10^{6bc}$	$(7,3\pm1,2)\times10^{6bc}$	$(8,0\pm1,1)\times10^{6bc}$	$(7,7\pm0,9)\times10^{7abc}$
Молочнокислі бактерії	$(5,2\pm0,5)\times10^{8}$	$(2,5\pm0,1)\times10^{6}$	$(1,8\pm0,1)\times10^{6}$	$(6,3\pm0,1)\times10^{6abc}$	$(6,8\pm1,1)\times10^{6abc}$	$(1,2\pm0,3)\times10^{7abc}$	$(6,4\pm0,6)\times10^{7abc}$	$(8,2\pm1,1)\times10^{7abc}$
Загальна кількість кишкової палички	$(5,2\pm0,3)\times10^{5}$	$(2,0\pm0,1)\times10^{6}$	$(1,5\pm0,2)\times10^{5}$	$(1,3\pm0,1)\times10^{5ab}$	$(3,0\pm0,3)\times10^{6abc}$	$(1,4\pm0,2)\times10^{6abc}$	$(2,5\pm0,4)\times10^{6ac}$	$(2,3\pm0,6)\times10^{6}$
Кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю,%	84	81	77	78	82	84	81	82
Кишкова паличка зі слабко вираженою ферментативною активністю,%	16	19	23	22	18	16	19	18
Дріжджоподібні гриби	$(5,5\pm,0,6)\times10^{3}$	$(5,5\pm0,6)\times10^{3}$	$(1,0\pm0,2)\times10^{4}$	$(3,7\pm0,6)\times10^{4abc}$	$(3,0\pm0,2)\times10^{3abc}$	$(1,5\pm0,5)\times10^{2abc}$	$(3,0\pm0,1)\times10^{2abc}$	$(5,0\pm0,2)\times10^{2abc}$

Примітка: a-достовірна різниця порівняно з першою групою, при значені P≤0,05; b-достовірна різниця порівняно з другою групою, при значені P≤0,05;c-достовірна різниця порівняно з третьою групою, при значені P≤0,05.

Таблиця 3.23

Склад мікробіоти кишківника молодняку кролів на 14-й день експерименту, КУО/г (M±m, n=8)

Групи бактерій	Контрольні групи тварин			Дослідні групи травин				
	Перша група (Інтактна)	Друга група (Імунобактерин-D)	Третя група (вода)	Четверта група (1 мл/л)	П'ята група (5 мл/л)	Шоста група (10 мл/л)	Сьома група (50 мл/л)	Восьма група (100 мл/л)
Біфідобактерії	$(4,3±0,8)×10^{6}$	$(3,7±0,3)×10^{6}$	$(2,2±0,6)×10^{6}$	$(4,0±0,5)×10^{6c}$	$(3,7±0,6)×10^{6c}$	$(3,5±0,5)×10^{6c}$	$(4,0±0,8)×10^{6c}$	$(1,2±0,3)×10^{7abc}$
Молочнокислі бактерії	$(3,1±0,1)×10^{8}$	$(1,2±0,1)×10^{7}$	$(5,8±1,1)×10^{6}$	$(5,7±0,6)×10^{6ab}$	$(1,7±0,1)×10^{7abc}$	$(1,8±0,1)×10^{7abc}$	$(4,5±0,5)×10^{8bc}$	$(7,0±0,1)×10^{8abc}$
Загальна кількість кишкової палички	$(1,8±0,1)×10^{6}$	$(4,5±0,6)×10^{6}$	$(3,7±0,3)×10^{6}$	$(4,7±0,8)×10^{6a}$	$(3,7±0,7)×10^{6a}$	$(5,0±0,1)×10^{6ac}$	$(4,2±0,7)×10^{6a}$	$(4,1±0,8)×10^{6a}$
Кишкова паличка з нормальною ферментативною активністю,%	86	83	79	82	81	83	82	81
Кишкова паличка зі слабко вираженою ферментативною активністю,%	14	17	21	18	19	17	18	19
Дріжджоподібні гриби	$(1,8±,0,3)×10^{3}$	$(3,0±0,2)×10^{3}$	$(1,8±0,6)×10^{4}$	$(1,0±0,2)×10^{4ab}$	$(0,7±0,1)×10^{4abc}$	$(2,0±0,1)×10^{3bc}$	$(7,8±1,3)×10^{2abc}$	$(1,8±0,4)×10^{2abc}$

Примітка: a-достовірна різниця порівняно з першою групою, при значені P≤0,05; b-достовірна різниця порівняно з другою групою, при значені P≤0,05;c-достовірна різниця порівняно з третьою групою, при значені P≤0,05.

3.3.4. Оцінка ефективності штаму *L. rhamnosus* 13/2 при відгодівлі кролів

Нами виявлена істотна різниця маси тіла під час відгодівлі кролів при додаванні штаму *L. rhamnosus* 13/2 до раціону кроленят (табл. 3.24.).

Таблиця 3.24

Маса тіла та приріст кролів під час відгодівлі

Вік кролів, доба	Середня маса тіла, г	
	Контрольна група, n=32	Дослідна група, n=34
35	771±120	769,30±165
42	1016,32±152	1198,94*±180
49	1218,84±229	1390,73*±256
56	1395,68±283	1468,06±268
63	1629 ±278	1680,76±232
70	1874,64 ±277	1891,09±247
77	2119,40±290	2125,55±259
84	2387±310	2442,55±266
Приріст маси тіла від 35 до 84доби, г	1616±256	1673,25±203

Тварини дослідної групи були важче тварин контрольної групи. Різниця була статистично значущою і зберігалася упродовж першого періоду відгодівлі (до 56 днів). Середня вага тварин в кінці відгодівлі виявилась однаковою в обох групах. Ці результати вказують на те, що введення штаму *L. rhamnosus* 13/2 до раціону кролів не приводить до збільшення їх маси тіла.

Результати відгодівлі кроликів представлені в таблиці 3.25. Відомо, що на кролячих фермах смертність відлученого молодняку становить близько 10-12 % [31, 299, 332, 348, 408]. В експериментальній групі цей показник був значно меншим (3 %), що може бути результатом застосування штаму *L. rhamnosus* 13/2. Також було відзначено поліпшення стану здоров’я тварин в експериментальній групі (менше випадків діареї).

Таблиця 3.25

Стан здоров'я кролів на відгодівлі

Показник	Контрольна група	Дослідна група
Кількість відлучених тварин	32(100%)	34(100%)
Кількість тварин з діареєю	9(28,12%)	7(20,59%)
Смертність	4(12,5%)	1(2,94%)
Збереженість	28(87,5%)	33(97,06%)

Результати споживання корму при відгодівлі представлені в таблиці 3.26 Введення в раціон МКБ вплинуло на ефективність конверсії корму. В групах середня витрата корму на 1 кг приросту статистично відрізнявся, витрати корму зменшилися на 9 %.

Таблиця 3.26

Споживання корму кроликами на відгодівлі

	Контрольна група	Дослідна група
Середнє споживання корму при відгодівлі (кг на 1 кг приросту)	3,66 ± 0,32	3,33* ± 0,22

Примітка: * – достовірна різниця по відношенню до контрольної групи при $p < 0,05$.

По закінченню досліду було забито 21 тварину контрольної групи та 27 – дослідної. Результати розтину представлені в табл. 3.27 Істотної різниці нами між дослідними та контрольними тваринами не виявлено.

Таблиця 3.27

Результати розтину кроликів

Показники маси, г	Контрольна група, n=21	Дослідна група, n=27
Тіла до забою	2298 ±260	2295 ±258
Голови	152 ±17	146 ±13
Шкіри	356 ±53	351 ±58
ШКТ	338 ± 26	334 ±49
М'ясних субпродуктів	94 ±13	92 ±15
Туші	1243 ±159	1258 ±160
Охолодженої туші	1137 ±161	1157 ±155

Надалі було розраховано забійний вихід (маса охолодженої туші/маса тіла до забою×100 %), дані наведено в табл. 3.28 Спостерігався більший відсоток забійного виходу в дослідній групі при однаковій вазі тіла в обох групах. Різниця в ефективності забою може бути обумовленою більшою середньою масою тіла при відлученні молодих кроликів в експериментальній групі.

Таблиця 3.28

Результати середнього процентного забійного виходу кроликів на відгодівлі

Групи	Контрольна група, n=21	Дослідна група, n=27
забійний вихід, %	51,81 ±1,8	52,94±2,4

Отримані результати свідчать про ефективність додавання штаму *L. rhamnosus* 13/2 до раціону під час відлучення кроленят. Це приводить до покращення стану здоров’я, а саме зменшення кількості тварин, у яких виявлено діарею. Також при використанні МКБ знизились смертність та витрати корму на 9,56 % та 9, 00 % відповідно.

3.4. Економічна ефективність вирощування молодняку кролів при використанні *L. rhamnosus* 13/2

Економічна ефективність є важливим критерієм оцінки при впровадженні кормових добавок у сільськогосподарське виробництво, оскільки вона визначає їх доцільність застосування у тваринництві. Тому було визначено економічний ефект від застосування *L. rhamnosus* 13/2 у технології вирощування молодняку кролів. Розрахунок собівартості кормової добавки представлений в табл. 3.29.

Таблиця 3.29

Розрахунок собівартості кормової добавки

Витрати		Ціна	Вартість грн на 1л кормової добки
Матеріальні	молоко	7400 грн/т	7,4
	панкреатин	23 грн/упк	2,3
	хлороформ	20 000 грн/т	<0,1
Оплата праці		28,31 грн/год	<0,1
Амортизація	Обладнання	-	<0,1
	Матеріали	-	<0,1
Енергоресурси		0,9 грн/кВт	<0,1
Інше		-	<0,1
Всього			10,3

Відомо, що норми споживання води тваринами залежать від температури навколишнього середовища та типу годівлі. Від початку дослідження в середньому кролик до 42 доби випивав 0,60 л води, до 77 доби ще 5,70 л та до закінчення експерименту ще 1,33 л. В середньому за час експерименту витрати води становили 7,63 л на 1 гол., тобто 3,93 грн на 1 гол упродовж облікового періоду. Враховуючи, що тваринам дослідної групи додавали до питної води суспензію МКБ культивованих на гідролізованому молоці в розрахунку 50 мл/л питної води.

Для оцінки економічної ефективності виробництва кролятини в експерименті враховували витрати на 1 гол., собівартість 1 кг приросту, прибуток (чистий та недоотриманий) (табл. 3.30).

Таблиця 3.30

Основні показники економічної ефективності вирощування молодняку кролів при використанні МКБ

Показники	Групи тварин		в % до контролю
	Контрольна	Дослідна	
Вартість отриманої продукції на 1 гол., грн	173,36	180,84	+4
Загальногосподарські витрати, грн	45,86		-
Вартість спожитих кормів на 1 гол, грн	35,14	33,37	-5
Витрати повязані із застосуванням кормової добавки, грн	-	4,87	-
Разом витрат на 1 гол., грн	81,00	85,10	+5
Отримано прибутку на 1 гол, грн	92,36	95,74	+4
Собівартість 1 кг приросту, грн	21,96	19,98	-9
Рентабельнысть, %	114,0	112,5	-1,5
Недоотриманий прибуток, грн	369,44	92,36	-75

Примітка: розрахунок за обліковий період дослідів тривалістю 7 тижнів.

При додаванні до питної води кролям штаму *L. rhamnosus* 13/2 спостерігається незначне збільшення витрат (5 %), пов’язаних із застосуванням кормової добавки, із розрахунку на 1 гол. – на 4,10 грн. Витрати на застосування кормової добавки складалися із собівартості бактеріальної суспензії (3,93 грн на 1 гол упродовж облікового періоду) і затраченого робочого часу для розведення певної кількості кормової добавки у питній воді. Враховуючи, що вищезазначена операція здійснюються одноразово для тварин дослідної групи, витрати робочого часу у перерахунку на 1 гол. є мінімальними і знаходяться у межах 1 хв робочого часу персоналу на кролефермі. У господарстві, на базі яких проводили визначення ефективності застосування штаму *L. rhamnosus* 13/2, місячна оплата доглядача за тваринами відповідає законодавчо встановленій мінімальній заробітній платі в Україні(28,31 грн/год з

ЄСВ). Впродовж облікового періоду на 1 гол. витрачалося близько 2 хв. робочого часу, що відповідає 0,94 грн оплати праці.

Позитивний економічний ефект спостерігається при збільшені вартості реалізованої продукції на 1 гол. на 7,48 грн (4 %) у дослідній групі, при ціні тушки 140 грн/кг. Собівартість 1 кг приросту знизилась на 1,98 грн (9 %) у дослідній групі. Також використання кормової добавки зменшило вартість витрат на спожиті корми на 1 гол. на 1,77 грн (5 %) при вартості корму 6 грн/кг.

Варто зазначити, що при використанні кормової добавки рентабельність знизилась на 1,5 %. Однак, додавання штаму *L. rhamnosus* 13/2 до питної води позитивно впливає на збереженість поголів'я кроликів, внаслідок цього недоотриманий прибуток у дослідній групі знизився на 277,08 грн (75 %). При перерахунку на 1 гол, недоотриманий прибуток становив 2,79 грн та 13,99 грн в дослідній та контрольній групах, відповідно. Тому використання кормової добавки є повністю окупним.

Отже, додавання до питної води кролям штаму *L. rhamnosus* 13/2 сприяє підвищенню економічної ефективності, особливо внаслідок зниження недоотриманого прибутку. Економічний ефект досягається без значних додаткових затрат, що потребують суттєвих капітальних вкладень. Додаткові витрати, пов’язані із застосуванням кормової добавки окупаються.

3.5. Розробка технології отримання кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2

На основі проведених експериментальних дослідів була розроблена біотехнологія кормової добавки для кролів на основі про біотичного штаму *L. rhamnosus* 13/2 (рис. 3.10).

Рис. 3.10. **Технологічна схема отримання кормової добавки**

Якість пробіотику та ефективність способу отримання залежать від якості та складу поживних середовищ, які обумовлені видом основи субстрату і специфікою стимулювальних компонентів для здійснювання культивування мікроорганізмів [317, 369]. У біотехнологічному процесі створення лікувально-профілактичних пробіотиків велику увагу приділяють досягненню максимального рівня виходу біомаси життєздатних клітин бактерій та, відповідно, синтезованих ними біологічно активних речовин.

При підборі штамів слід враховувати їх технологічність у виробничих умовах і стабільність при культивуванні з урахуванням збереження пробіотичних властивостей. Ці показники визначають продуктивність, конкурентоздатність і рентабельність технологічного процесу [335, 409, 410].

Відомо, що для культивування молочнокислих бактерій в монокультурі або в композиції з іншими молочнокислими, найкращим поживним середовищем є MRS [376]. Однак, для зниження затрат при виробництві рекомендовано використовувати гідролізоване молоко.

Приготування гідролізованого молока:

Натуральне або відновлене знежирене молоко кип'ятять або обробляють текучим паром протягом 20 хв і охолоджують до температури (45±2) °С. Доводять активну кислотність до pH (7,7±0,1), додаючи водний розчин з масовою часткою NaOH 40 %. До 1000 $см^3$ молока додають від 0,5 до 1,0 г порошку панкреатину. Потім до молока додають від 5 до 6 $см^3$ хлороформу. Колбу закривають корковою пробкою і витримують при температурі (40±2) °С протягом 18-24 год. Протягом перших 3-5 год молоко 2-3 рази перемішують (пробку після перемішування відкривають для видалення хлороформу).

Потім гідролізоване молоко фільтрують через паперовий фільтр, розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:1, встановлюють активну кислотність pH (7,1 ± 0,1), додаючи водний розчин з масовою часткою NaOH 40 % і використовують для приготування живильного середовища. Гідролізоване молоко стерилізують в автоклаві при температурі (121±1) °С упродовж 15 хв.

В приготовлене гідролізоване молоко вносять 5 % активної культури штаму *L. rhamnosus* 13/2 та культивують за температури (37±2) ° С протягом 48 годин. Стартова культура систематично перевіряється за показниками вказаними в паспорті.

Після культивування можливе утворення осаду. Однак це пов’язано з особливостями росту саме МКБ. Цей осад не потрібно фільтрувати, в ньому як правило присутні життєздатні клітини. Після закінчення часу культивування, необхідно відібрати зразок для визначення чисельності МКБ. МКБ добре накопичуються на гідролізованому молоці і їх чисельність як правило перевищує $1x10^8$ КУО/мл. Надалі для підвищення рентабельності культуральну рідину необхідно розбавити, щоб титр бактерій становив не менше $1x10^8$

КУО/мл. Після чого кормову добавку можна реалізувати. Отриманий препарат може зберігатися продовж 12 місяців при температурі ≥4 °С.

Таким чином, розроблена технологія виробництва не потребує ніякого спеціального обладнання і може бути реалізована на мікробіологічних підприємствах та підприємствах з виготовленню біологічно активних добавок.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Кролівництво є перспективною галуззю тваринництва [335]. Однак поголів’я кролів в Україні на сьогодні істотно знизилось, якщо порівнювати з попередніми роками [277]. Це пов’язано з рядом причин, що заважають ефективному веденню кролівництва. До основних причин належать інфекційні захворювання шлунково-кишкового каналу тварин, що найчастіше спостерігаються у молодняку та часто призводять до загибелі тварин [248]. Упродовж тривалого часу для розв'язання даної проблеми використовувались антибіотики, що призвело до виникнення набутої антибіотикорезистентності патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. У зв’язку з чим на сьогодні за даними Всесвітньої організації охорони здоров’я (ВООЗ), стійкість бактерій до антибіотиків є однією із найсерйозніших загроз людства [383]. Також євроінтеграційний шлях розвитку України обумовлює появу в галузі тваринництва складніших вимог та завдань, спрямованих на забезпечення населення високоякісною сільськогосподарською продукцією, що відповідає міжнародним стандартам якості та безпеки. Відповідно до нормативних документів продукція тваринного походження не повинна містити антибіотики, токсичні речовини та патогенні мікроорганізми [294].

Враховуючи вищезазначене, упродовж останніх років в Україні та світі зріс інтерес до бактеріальних препаратів на основі живих мікробних культур – пробіотиків [64]. Пробіотичні препарати використовуються для профілактики та лікування шлунково-кишкових інфекцій різної етіології, для стимулювання імунітету, при розладах травлення аліментарної етіології, що виникають внаслідок різкої зміни складу раціону, порушення режимів годівлі, технологічних стресів, а також при зміні складу кишкової мікробіоти після використання антибіотиків. Окрім систематизованого підходу зі скринінгу пробіотичних штамів та конкретної рекомендації щодо застосування, важливою є розробка методологічних підходів щодо оцінювання біологічних властивостей

мікроорганізмів, які будуть використані для створення пробіотичних препаратів [288, 325, 378].

На сьогодні пробіотики, що застосовуються для кролів, мають у своєму складі біоагенти, виділені як правило з різних еконіш. Такі пробіотики є універсальними та рекомендовані для різних видів тварин. Однак відомо, що ефективність пробіотиків у тваринництві обумовлена саме біоагентами, що входять до складу пробіотиків. Тому актуальним завданням залишається пошук перспективних для створення пробіотичних препаратів мікроорганізмів, що є представниками облігатної мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів.

Бактерії роду *Lactobacillus* частина молочнокислих бактерій, що загально визнані як абсолютно безпечні і мають статус «GRAS» та «QPS». Ці бактерії є біоагентами багатьох пробіотичних препаратів, які широко застосовують у харчовій промисловості [330, 287], медицині, ветеринарії [352, 391] та сільському господарстві [276, 306, 352, 391]. Нашими дослідженнями встановлено, що МКБ є найбільш чисельною ($(7,4\pm0,3)\times10^8$ КУО/г) групою бактерій серед представників облігатної мікробіоти у шлунково-кишковому каналі кролів, незалежно від типу годівлі. У багатьох публікаціях [171, 190, 270, 273, 384] представлено, що кормові добавки на основі МКБ проявляють високу ефективність. Враховуючи вищезазначене, селекція була спрямована на пошук біологічно активних штамів саме бактерій роду *Lactobacillus*. У період з 2014 по 2016 роки було виділено та досліджено 250 ізолятів МКБ. За фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками досліджувані бактерії були попередньо віднесено до бактерій роду *Lactobacillus*.

Відомо, що антимікробний ефект цих МКБ обумовлюється дією основних продуктів метаболізму – молочної та інших органічних кислот, що знижують pH середовища та відіграють роль бактерицидного фактора [282; 314]. Спираючись на дане твердження, первинний скринінг МКБ проводили за значенням кислотоутворюючої активності. Первинний відбір ізолятів, виділених зі ШКК кролів, проводили за граничним значенням кислотоутворення. Більша частина ізолятів – 145 (58 % від загальної

кількості) – характеризувалися активністю кислотоутворення, яка не перевищувала 99 °Т. 35 % ізолятів проявляли кислотоутворюючу активність на рівні 100-149 °Т, 3 % – на рівні 150-199 °Т. Найвищою активністю кислотоутворення (понад 200 °Т) відзначалися 10 ізолятів МКБ (4 % від загальної кількості), які були відібрані нами для подальшої роботи. Під час дослідження встановлено дуже сильну кореляцію (r=0,94) між титруємою та граничною кислотністю.

При виборі біологічного агента, насамперед слід дотримуватися принципу технологічності штамів, основу якого становлять показники стабільності росту бактерій. В наших дослідженнях встановлено, що загалом параметри росту залежали від штаму мікроорганізмів. Відмічена істотна різниця за такими показниками: швидкість експоненціального зростання, константа швидкості ділення, час генерації. При дослідженні параметрів росту виявлено, що найбільш швидкорослими були три ізоляти: L-13/2, L-31/2 та L-39/2. Показник T_l для цих культур був найнижчий, у порівнянні з рештою досліджуваних бактерій. Під час досліджень виявлено, що ізоляти L-4/, L-13/2, L-31/2, L-39/2, L-49/1 сквашували молоко найшвидше (4,8–6,27 год). Відомо, що молокозсідальна активність молочнокислих бактерій залежить не лише від кислотоутворення, а часто обумовлена продукуванням певних екзополісахаридів. Нашими дослідженнями встановлено, що МЗА МКБ виділених від кролів дуже слабо залежала від кислотоутворюючої здатності (r=0,152) та слабо – від чисельності бактерій у стаціонарній фазі росту (r=-0,278), більшою мірою – від протеолітичної активності (r=-0,347). Тому на нашу думку, даний показник залежить від продукування екзополісахаридів.

Відомо, що ефективність пробіотичного препарату щодо профілактики та лікування інфекційних захворювань обумовлена антагоністичною активністю його біоагентів. Тому при виборі штамів бактерій для препаратів основну увагу приділяють їх антагоністичним властивостям до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Відомо, що бактерій роду *Lactobacillus* проявляють широкий спектр антагоністичної активності. У дослідах *in vitro*

показано, що молочнокислі бактерії, виділені від кролів, утворювали зони затримки росту до типових збудників кишкових інфекцій: *Proteus mirabilis* № 3177, *Proteus vulgaris* № 13, *Staphylococcus aureus* № 906, *Salmonella typhimurium* № 89, *Shigella flexneri* 2a № 160, *Klebsiella pneumoniae* № 67, *Escherichia coli* 055K59 № 3912, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853. Розміри зон затримки росту істотно різнились і залежали від антагоністичної активності досліджуваних штамів молочнокислих бактерій та тест-культури патогенних мікроорганізмів. Нами також показано, що антагоністична активність молочнокислих бактерій до патогенних мікроорганізмів змінюється залежно від живильного середовища, на якому культивували досліджувані ізоляти. Наприклад, у 82 % досліджуваних штамів молочнокислих бактерій при культивуванні на агаризованому гідролізованому молоці та середовищі MRS встановлено збільшення зон пригнічення росту *Escherichia coli* на 45 % та 52 % відповідно проти варіанту культивування молочнокислих бактерій на агаризованому знежиреному молоці[370]. Отримані результати можна пояснити тим, що бактерії роду *Lactobacillus* належать до ауксотрофних мікроорганізмів, що обумовлює необхідність використання багатих на живильні компоненти середовищ. Загалом найвища антагоністична активність відмічена в ізоляту L-13/2, що утворював найбільші зони затримки росту до всіх використаних у роботі тест-культур, незалежно від середовища культивування.

У подальших дослідженнях було з’ясовано, що фактор кислотоутворення здійснює непрямий вплив на антагоністичну активність досліджуваних ізолятів, між показниками кислотоутворення та розміром зони затримки росту тест-культур встановлено слабкий кореляційний зв'язок. Вищезазначене дає змогу припустити, що антагоністична активність молочнокислих бактерій, виділених від кролів, обумовлена продукуванням не тільки органічних кислот, але і біологічно активних речовин бактерицидної дії.

Спираючись на отримані результати, ознака кислотоутворення не може бути вирішальною при селекції біоагентів для виготовлення пробіотиків.

Окрім антагоністичної активності важливим аспектом, що впливає на ефективність пробіотичних препаратів, є також рівень адгезивної активності мікроорганізмів, що входять до їх складу. Високий рівень адгезії пробіотичних бактерій забезпечує їх прикріплення до поверхні епітеліоцитів, сприяє колонізації слизової шлунково-кишкового каналу та стимуляції росту представників облігатної мікробіоти, що перешкоджає адгезії і розмноженню умовно-патогенних мікроорганізмів і їх токсичному впливу на організм тварини [320, 405]. Крім того, здатність самоагрегації пробіотичних мікроорганізмів, яка визначається як здатність клітин одного виду до самозлипання, пов’язана з їх адгезивними властивостями [136, 209]. Автоагрегація пробіотичних клітин дозволяє досягти вищої щільності популяції та стабільності в ШКК господаря, як результат – зменшення впливу несприятливих умов на життєздатність клітин [136, 231]. З цієї причини адгезивні властивості були запропоновані багатьма авторами як один з основних критеріїв відбору нових штамів для використання як біовгентів пробіотиків [216, 226]. У наших дослідженнях встановлено, що МКБ, виділені від кролів, проявляли найвищий рівень адгезії (83 %) до еритроцитів крові кроля. Значно нижчий рівень адгезії виявлений до еритроцитів миші (75 %), свині (66 %), людини (58 %), ВРХ (51 %). Адгезивні властивості залежали здебільшого від походження еритроцитів крові, ніж від штаму бактерій. Це ще раз підтверджує, що специфічність біоагенту пробіотичного препарату до виду тварин, для яких він застосовується, відіграє неабияку роль у забезпеченні його високої ефективності.

Пробіотичні мікроорганізми повинні бути здатними виживати у внутрішньому середовищі господаря, включаючи шлункові кислоти та солі жовчі, щоб досягти та колонізувати тонкий кишківник та товсту кишку, а також бути метаболічно активними [237]. Відібрані штами продемонстрували високу стійкість до метаболітів травної системи. Більшість (80 %) досліджуваних ізолятів зберігали активність росту у живильному середовищі при зниженні pH до 4,0, а також високому вмісту натрію хлориду та гідроген хлориду до 5 і 3 %,

відповідно. Відмічено, що всі МКБ використані в роботі зберігали активність росту за наявності фенолу (0,5 %) та жовчі (40 %). Тому виділені нами штами можна вважати здатними витримати несприятливі умови шлунково-кишкового каналу і колонізувати кишківник шляхом їх адгезії до клітин епітелію та слизової.

На думку деяких авторів, мікробні ізоляти, призначені для використання як біоагенти пробіотиків, повинні виявляти помірну стійкість до антибіотиків [38]. У наших дослідженнях встановлено, що п'ять (50 %) відібраних штамів *Lactobacillus* були більш стійкими до інгібіторів синтезу білків (еритроміцин, тетрациклін, стрептоміцин), що узгоджується з даними, які наводять у своїх дослідженнях M. Hyacinta [33] та N. S. Casarotti [143]. Крім того, було встановлено, що більшість досліджуваних штамів (80 %) є стійкими до інгібіторів трансептидази (ампіцилін), мінімальна інгібуюча концентрація становила більше 5 μg /см^3. Однак всі досліджувані бактерії були дуже чутливі до інгібіторів синтезу пептидоглікану (бензилпеніцилін), що узгоджується з даними, представлених іншими дослідниками [33, 214]. Також виявлено стійкість до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти найперспективнішого ізоляту *Lactobacillus sp.* 13/2. На підставі результатів дослідження можна зробити висновок, що пробіотичні штами, які були виділені від кролів, сприйнятливі до антибіотиків, що інгібують трансептидази та дуже чутливі до інгібіторів синтезу пептидоглікану. Дискусійним є питання про здатність молочнокислих бактерій до горизонтального перенесення генів антибіотикорезистентності. Хоча з наукової літератури відомо, що більшість представників МКБ не мають такої здатності, описано поодинокі випадки перенесення генів резистентності від молочнокислих бактерій [71, 110]. Для виключення такої можливості зазначене питання потребує більш детального вивчення. Вважаємо, що на сьогодні наявність антибіотикорезистентності пробіотичних штамів скоріше є перевагою, адже дозволяє зберігати ефективність пробіотичних препаратів під час або одразу після антибіотикотерапії.

Наступним етапом нашої роботи було проведення ідентифікації досліджуваних ізолятів. За результатами досліджень п’ять ізолятів було класифіковано як облігатно гетероферментативні, вони розвивалися за температури 45 ^{o}C та не розвивалися при 15 ^{o}C, не зброджували рибозу, не утворювали газ з глюкози. Інші п’ять ізолятів не росли при температурі 45°C, а розвивалися при 15 ^{o}C, зброджували рибозу та утворювали газ з глюкози та продукували альдолазу. Відповідно їх було класифіковано як факультативно гетероферментативні молочнокислі бактерії. Всі досліджувані ізоляти не проявляли нітратредуктазної активності. А також у всіх їх виявлено фермент альдолазу, тому жоден не було віднесено до облігатно гетероферментативних молочнокислих бактерій. При дослідженні біохімічних властивостей, а саме здатності зброджувати вуглеводи, досліджувані ізоляти було попередньо класифіковано до філогенетичних груп: L-13/2, L-31/2, L-49/1 – *Lactobacillus acidophilus*, L-4/1, L-39/2 – *L.lactis*, L-5/4 – *L. casei*, L-16/1, L-16/3, L-17/2, L-17/3 – *L. plantarum*. Класифікація бактерій роду *Lactobacillus* є однією з найскладніших на сьогодні й гомологія видів є дуже близькою. Відомо, що класифікація на основі особливостей метаболізму є недостатньою. Представники філогенетичної групи *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus* фенотипово споріднені [155, 162].

Для подальших досліджень як найбільш перспективний було відібрано штам *Lactobacillus sp.* 13/2 (L-13/2), проведено більш детальну його ідентифікацію. Відповідно до здатності використовувати вуглеводні, як єдине джерело карбону, штам *Lactobacillus sp.* 13/2 був ідентифікований до виду *L. helveticus*. Однак молекулярно-генетичними методами з використанням полімеразної ланцюгової реакції було встановлено, що досліджуваний ізолят не містить генів, які наявні у більшості видів *L. acidophilus, L. helveticus*. Тому було проведено філогенетичний аналіз досліджуваного штаму. За аналізом нуклеотидної послідовністі фрагменту гена 16S рРНК штам *Lactobacillus sp.* 13/2 найбільш подібний до виду *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

Новий перспективний штам *L. rhamnosus* 13/2 не тільки відзначався широким спектром пробіотичних властивостей, але і найбільш чітко серед досліджуваних штамів відповідав вимогам ВООЗ до пробіотиків.

Так, відповідно до вимог законодавства біоагент повинен бути безпечним [48, 367]. Зважаючи на це, було досліджено вірулентність штаму *L. rhamnosus* 13/2 на лабораторних тваринах. Отримані результати свідчать про авірулентність досліджуваних бактерій і нездатність їх до інвазії у внутрішні органи лабораторних тварин (ЛД50 в/ч $>2\times10^9$, ЛД50 *per os* $>36\times10^9$ клітин/мишу). Даний штам віднесено до IV класу безпеки мікроорганізмів, тому його можна використовувати як біоагент для пробіотичного препарату.

Відомо, що використання пробіотичних препаратів є найбільш ефективним саме для профілактики інфекційних захворювань. Тому надалі було проведено дослідження штаму *L. rhamnosus* 13/2 у дослідах *in vivo* з метою профілактики сальмонельозних інфекцій. В останні роки захворювання на сальмонельоз тварин і людей має сталу тенденцію до збільшення, що обумовлює низку проблем ветеринарного, економічного та екологічного характеру [313, 359, 370, 373]. Виявлено позитивний ефект введення молочнокислих бактерій упродовж 14 діб перед інфікуванням збудниками сальмонельозу тварин. Введення дослідним тваринам штаму *L. rhamnosus* 13/2 дало змогу забезпечити збереженість 100 % дослідних тварин у групі у разі зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і 90 % – *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko.* Позитивний ефект від введення молочнокислих бактерій спостерігався також після введення збудників сальмонельозу дослідним тваринам. Відмічено, що вже на п’яту добу введення дослідним тваринам *L. rhamnosus* 13/2, у деяких мишей дослідних груп спостерігали відсутність клінічних ознак захворювання. По закінченню експерименту збереженість тварин становила 73 та 67 % під час зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і *Salmonella enteritidis* Ч1 *var. Issatschenko*, відповідно. Отриманий позитивний ефект застосування бактерій *L. rhamnosus* 13/2 для профілактики сальмонельозу в лабораторних тварин, на нашу думку, пояснюється наявністю у досліджуваного штаму молочнокислих

бактерій високої антагоністичної активності до збудників сальмонельозних інфекцій. Крім того, висока адгезивна активність молочнокислих бактерій, сприяла колонізації штамом *L. rhamnosus* 13/2 слизової оболонки шлунково-кишкового каналу дослідних тварин. У зв'язку з цим, загалом підвищилася захисна здатність облігатної мікробіоти шлунково-кишкового каналу, що перешкодило колонізації збудників сальмонельозних інфекцій на слизовій оболонці кишківника дослідних тварин.

Відомо, що здоров'я та продуктивність тварин залежить від балансу мікробіоти шлунково-кишкового каналу. У модельному експерименті, встановлено, що пролонговане введення штаму *L. rhamnosus* 13/2 упродовж 14 діб сприяє відновленню балансу кишкової мікробіоти дослідних тварин, порушеного внаслідок використання антибіотиків. Відмічено, що введення більших доз (50 та 100 мл) бактеріальної суспензії сприяло збільшенню чисельності молочнокислих бактерій, у порівнянні з тваринами контрольної групи. На кінець експерименту спостерігалось збільшення біфідобактерій та МКБ у дослідних групах, проти інтактної групи. Також зберігалась тенденція до зменшення чисельності дріжджеподібних грибів у дослідних тварин, що отримували 10 і більше мл/л води бактеріальної суспензії. Враховуючи отримані результати, доцільно використовувати даний штам бактерій як основу препарату для нормалізації мікробіоти шлунково-кишкового каналу тварин.

У кролівництві особливої уваги потребує питання збереження молодняку з моменту відлучення від кролематок, саме в цей період спостерігається найактивніший безсимптомний падіж. Головною причиною якого є недостатньо сформований імунітет, внаслідок чого кроленята є найбільш вразливі до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. За промислового досліду встановлено, що введення штаму *L. rhamnosus* 13/2 до раціону кролів, призводить до збільшення збереження поголів'я. Смертність відлученого молодняку знизилась з 12 % до 3 %. Спираючись на отримані результати, можна зробити висновок, що введення молочнокислих бактерій позитивно впливає на імунітет тварин. Також було відзначено поліпшення стану здоров'я

тварин в експериментальній групі (менше випадків діареї). При аналізі споживання корму встановлено зниження на 9 % витрат корму на 1 кг приросту у дослідній групі. Отримані результати свідчать про ефективність додавання штаму *L. rhamnosus* 13/2 до раціону під час відлучення кроленят.

Для оцінки економічної ефективності виробництва кролятини в експерименті враховували витрати на 1 гол, собівартість 1 кг приросту, прибуток (чистий та недоотриманий). Позитивний економічний ефект спостерігається при збільшені вартості реалізованої продукції на 1 гол. на 7,48 грн (4 %) у дослідній групі, при ціні тушки 140 грн/кг. Собівартість 1 кг приросту знизилась на 1,98 грн (9 %) у дослідній групі. Недоотриманий прибуток у дослідній групі знизився на 277,08 грн (75 %). При перерахунку на 1 гол., недоотриманий прибуток становив 2,79 грн та 13,99 грн в дослідній та контрольній групах, відповідно. Тому використання кормової добавки є повністю окупним.

За результатами проведеної роботи для кролів, що знаходяться на відгодівлі з метою підвищення профілактики шлунково-кишкових інфекцій, корекції балансу мікробіоти кишківника, а також зниження витрат кормів доцільно використовувати кормову добавку на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2. Використання 50 мл бактеріальної суспензії(1×10^9 КУО/мл) на 1 л питної води, забезпечить зниження витрат корму на 1 кг приросту на 9 %, а також підвищить збереженість поголів’я до 97,06 %.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено науково-теоретичне обґрунтування вирішення проблеми підвищення ефективності використання пробіотичних препаратів у кролівництві шляхом одержання методами аналітичної селекції нового перспективного штаму молочнокислих бактерій та розроблено технологію його використання як основи пробіотичного препарату.

1. Встановлено якісний та кількісний склад мікробіоценозу ШКК кролів за різних типів годівлі та дієти, що дає можливість глибше зрозуміти адаптаційні можливості мікробіоти кишківника кролів. За концентратного типу годівлі збільшується кількість біфідобактерій ($(5,8\pm0,6)\times10^7$ КУО/г) та дріжджеподібних грибів ($(1,2\pm0,2)\times10^5$ КУО/г) у порівнянні з комбінованим ($(4,2\pm0,2)\times10^6$ та $(9,8\pm1,2)\times10^3$ КУО/г, відповідно). Введення в раціон кролів значної частки сіна призводить до зменшення кількості біфідобактерій ($(7,4 \pm 1,5)\times10^5$ КУО/г) та збільшення кількості анаеробних бацил ($(5,37\pm0,7) \times 10^9$ КУО/г). Раціон, основу якого складає зерно, приводить до підвищення кількості молочнокислих бактерій ($(2,5\pm0,5)\times10^9$ КУО/г) та зниження кількості дріжджеподібних грибів ($(3,4\pm0,7)\times10^3$ КУО/г).

2. Зі шлунково-кишкового каналу кролів виділено 250 ізолятів молочнокислих бактерій. За культурально-морфологічними властивостями їх ідентифіковано до роду *Lactobacillus*. Селекціоновано штам *L. rhamnosus* 13/2, що проявляє стабільні показники росту, граничну кислотоутворюючу активність до 350 ºТ, пригнічує розвиток патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів з зонами затримки їх росту від 18 до 27 мм, показник адгезії до еритроцитів крові кролів становить 96 %.

3. Використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 з метою профілактики зараження дослідних тварин бактерія роду *Salmonella* забезпечує збереженість від 67 до 100 % тварин. Застосування штаму *L. rhamnosus* 13/2 за дисбактеріозу кишківника кролів, викликаного внаслідок застосування антибіотиків, приводить до швидкого (три доби) відновлення балансу кишкової мікробіоти.

Корекція мікробіоти кишківника кролів у бік збільшення чисельності корисних мікроорганізмів спостерігається на 14-ту добу: збільшення чисельності біфідобактерій до $(1,2\pm0,3)\times10^{7}$ КУО/г, лактобактерій до $(7,0\pm0,1)\times10^{8}$ КУО/г.

4. Встановлено, що використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 за промислового вирощування кролів, приводить до зниження смертності та витрати корму на 9,56 % та 9,00 % відповідно, позитивно впливає на продуктивність молодняку кролів.

5. Запропоновано технологічну схему отримання пробіотичної кормової добавки на основі селекціонованого штаму *L. rhamnosus* 13/2, яка забезпечує максимальну стабільність та збереженість його біологічних властивостей. Розроблено та затверджено регламент на виробництво кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2.

6. За рахунок використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 витрати на спожиті корми на 1 гол. знижуються на 5,00 % та собівартість 1 кг приросту на 9,00 %. Використання кормової добавки є повністю окупним.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для кролів, що знаходяться на відгодівлі, з метою підвищення профілактики шлунково-кишкових інфекцій, відновлення та/або корекції балансу мікробіоти кишківника доцільно використовувати кормову добавку на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2. Використання 50 мл бактеріальної суспензії (1×10^9 КУО/мл) на 1 л питної води забезпечить зниження витрат корму на 1 кг приросту на 9 % та підвищить збереженість поголів'я до 97 %.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fang S., Xiong X., Su Y. 16S rRNA gene-based association study identified microbial taxa associated with pork intramuscular fat content in feces and cecum lumen. *BMC Microbiol*. 2017. Vol. 17. P. 1–9.

2. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets / D. Kantas et al. *Journal of Applied Microbiology*. 2015. No. 118. P. 727–738.

3. A Genome-Based Species Taxonomy of the *Lactobacillus* Genus Complex / S. Wittouck et al. *ASM Journals*. URL: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mSystems.00264-19 (date of access: 01.10.2022).

4. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes / V. Sharma et al. *Chemosphere*. 2016. No. 150. P. 702–714.

5. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life / D. H. Parks et al. *Nature biotechnolog*. 2018. Vol. 36, no. 10. 996-1004.

6. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* / J. Zheng et al. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2020. Vol. 70, no. 4. P. 2782–2858.

7. A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota / J. Zimmer et al. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2011. Vol. 66, no. 1. P. 53–60. URL: https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.141 (date of access: 13.10.2022).

8. Abdelhady D. H., El-Abasy M. A. Effect of Prebiotic and Probiotic on Growth, Immuno-hematological responses and Biochemical Parameters of infected rabbits with Pasteurella multocida. *Benha Veterinary Medical Journal*. 2015. Vol. 28, no. 2. P. 40–51.

9. Abdelqader A., Irshaid R., Al-Fataftah A.-R. Effects of dietary probiotic inclusion on performance, eggshell quality, cecal microflora composition, and tibia traits of laying hens in the late phase of production. *Tropical Animal Health and Production*. 2012. Vol. 45, no. 4. P. 1017–1024. URL: https://doi.org/10.1007/s11250-012-0326-7 (date of access: 13.10.2022).

10. Abdel-Raheem S. M., Abd-Allah S. M., Hassanein K. M. The effects of prebiotic, probiotic and synbiotic supplementation on intestinal microbial ecology and histomorphology of broiler chickens. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*. 2012. Vol. 6, no. 4. P. 277–289.

11. Abhisingha M., Dumnil J., Pitaksutheepong C. Selection of Potential Probiotic *Lactobacillus* with Inhibitory Activity Against *Salmonella* and Fecal Coliform Bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2017. Vol. 10, no. 2. P. 218–227. URL: https://doi.org/10.1007/s12602-017-9304-8 (date of access: 13.10.2022).

12. Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk / C. Charlier et al. *International Dairy Journal*. 2008. Vol. 18, no. 2. P. 197–203. URL: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.03.015 (date of access: 13.10.2022).

13. Adeniji A. A., Zubairu N. Nutritional value of palm kernel cake supplemented with or without probiotics to replace groundnut cake in the diets of weaner rabbits. *Journal of Animal Science Advances*. 2013. No. 3. P. 517–523.

14. Adeniji A. A., Duwa H., Umar M. The Value of Rice Husk Fed with or Without Probiotics and Enzymes Supplementation to Replace Groundnut Cake in the Dietsof Grower Rabbits. *Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences*. 2014. No. 3. P. 48–54.

15. Amber K. H., Yakout H. M., Hamed R. S. Effect of feeding diets containing yucca extract or probiotic on growth, digestibility, nitrogen balance and caecal microbial activity of growing New Zealand White rabbits. *Proceedings-8 th world rabbit congress*. Mexico. Puebla, 7–10 september. 2004 year.

16. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals / J. A. Jiminez et al. *Gut Pathogens*. 2015. Vol. 7, no. 1. URL: https://doi.org/10.1186/s13099-015-0076-y (date of access: 13.10.2022).

17. Antagonistic Activities and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Derived From a Plant-Based Fermented Food / A.-R. Choi et al. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. URL: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01963 (date of access: 13.10.2022).

18. Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7 / S. A. Rund et al. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013. Vol. 303, no. 1. P. 1–8. URL: https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.11.006 (date of access: 13.10.2022).

19. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* strains isolated from domestic geese / M. Dec et al. *British Poultry Science*. 2015. Vol. 56, no. 4. P. 416–424. URL: https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1058919 (date of access: 13.10.2022).

20. Antibiotics, Pediatric Dysbiosis, and Disease / P. Vangay et al. *Cell Host & Microbe*. 2015. Vol. 17, no. 5. P. 553–564. URL: https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.006 (date of access: 13.10.2022).

21. Antimicrobial activity of probiotics from milk products / J. E. Chuayana et al. *Phil J. Microbiol. Infect. Dis*. 2003. Vol. 32, no. 2. P. 71–74.

22. Ashraf R., Shah N. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research J*. 2011. Vol. 3, no. 18. P. 837–853.

23. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells / S. Grover et al. *The Indian Journal of Medical Research*. 2011. Vol. 134, no. 5. P. 664. URL: https://doi.org/10.4103/0971-5916.90992 (date of access: 13.10.2022).

24. Association of EnterotoxigenicBacteroides fragilisInfection with Inflammatory Diarrhea / C. L. Sears et al. *Clinical Infectious Diseases*. 2008. Vol. 47, no. 6. P. 797–803. URL: https://doi.org/10.1086/591130 (date of access: 13.10.2022).

25. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. / S. F. Barefoot et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. Vol. 60, no. 10. P. 3522–3528. URL: https://doi.org/10.1128/aem.60.10.3522-3528.1994 (date of access: 13.10.2022).

26. Begley M., Hill C., Gahan C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72, no. 3. P. 1729–1738. URL: https://doi.org/10.1128/aem.72.3.1729-1738.2006 (date of access: 13.10.2022).

27. Beneficial Effects of Long-Term Consumption of a Probiotic Combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult May Persist After Suspension of Therapy in Lactose-Intolerant Patients / C. C. Almeida et al. *Nutrition in Clinical Practice*. 2012. Vol. 27, no. 2. P. 247–251. URL: https://doi.org/10.1177/0884533612440289 (date of access: 13.10.2022).

28. Berg A. M., Kelly C. P., Farraye F. A. Clostridium difficile Infection in the Inflammatory Bowel Disease Patient. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013. Vol. 19, no. 1. P. 194–204. URL: https://doi.org/10.1002/ibd.22964 (date of access: 13.10.2022).

29. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Springer-Verlag)) / M. Goodfellow et al. Springer, 2012. 2083 p.

30. Systematic Bacteriology / ed. by W. B. Whitman. New York, NY : Springer New York, 2009. URL: https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5 (date of access: 13.10.2022).

31. Bernacka H., Święcicka N. Warunki utrzymania królików w różnych systemach chowu. *Przegląd hodowlany*. 2015. No. 5. P. 30–32.

32. Biernasiak J., Śliżewska K., Libudzisz Z. Negatywne skutki stosowania antybiotyków. *Postęp Nauk Rol*. 2010. No. 3. P. 105–117.

33. Bile tolerance and its effect on antibiotic susceptibility of probiotic *Lactobacillus candidates* / M. Hyacinta et al. *Folia Microbiologica*. 2014. Vol. 60,

no. 3. P. 253–257. URL: https://doi.org/10.1007/s12223-014-0365-8 (date of access: 13.10.2022).

34. Boulahrouf A., Fonty G., Gouet P. Establishment, counts, and identification of the fibrolytic microflora in the digestive tract of rabbit. Influence of feed cellulose content. *Current Microbiology*. 1991. Vol. 22, no. 1. P. 21–25. URL: https://doi.org/10.1007/bf02106208 (date of access: 13.10.2022).

35. Breukink E., de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006. Vol. 5, no. 4. P. 321–323. URL: https://doi.org/10.1038/nrd2004 (date of access: 13.10.2022).

36. Caecal microflora and fermentation pattern in exclusively milk-fed young rabbits / M. T. Padilha et al. *Reprod. Nutr. Dev.* 1999. No. 39. P. 223–230.

37. Cameron A., McAllister T. A. Could probiotics be the panacea alternative to the use of antimicrobials in livestock diets?. *Beneficial Microbes*. 2019. Vol. 10, no. 7. P. 773–799. URL: https://doi.org/10.3920/bm2019.0059 (date of access: 13.10.2022).

38. Capurso L. Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A review. *J. Clin. Gastroenterol*. 2019. No. 53. P. S 1– S 41.

39. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications / J. A. Reis et al. *Food Engineering Reviews*. 2012. Vol. 4, no. 2. P. 124–140. URL: https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2 (date of access: 13.10.2022).

40. Cell Surface-Associated Lipoteichoic Acid Acts as an Adhesion Factor for Attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to Human Enterocyte-Like Caco-2 Cells / D. Granato et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. Vol. 65, no. 3. P. 1071–1077. URL: https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1071-1077.1999 (date of access: 13.10.2022).

41. Changes in Cecal Microbiota and Mucosal Gene Expression Revealed New Aspects of Epizootic Rabbit Enteropathy / C. Bäuerl et al. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 8. P. e105707. URL: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105707 (date of access: 13.10.2022).

42. Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of probiotic strains / R. Linaje et al. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. Vol. 96, no. 4. P. 761–771. URL: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02191.x (date of access: 13.10.2022).

43. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry / M. A. Ehrmann et al. *Journal of Applied Microbiology*. 2002. Vol. 92, no. 5. P. 966–975. URL: https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01608.x (date of access: 13.10.2022).

44. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health / P. Kõll et al. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008. Vol. 23, no. 2. P. 139–147. URL: https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2007.00402.x (date of access: 13.10.2022).

45. Chralampopoulos D. C., Rastall R. A. Prebitics and probiotics science and technology. UK : Springer, 2009. 1265 p.

46. Colonic Microflora: Nutrition and Health0. Summary and Conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] Workshop held in Barcelona, Spain / M. B. Roberfroid et al. *Nutrition Reviews*. 2009. Vol. 53, no. 5. P. 127–130. URL: https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1995.tb01535.x (date of access: 13.10.2022).

47. Colonization and Immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the Human Gastrointestinal Tract / N. Valeur et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. Vol. 70, no. 2. P. 1176–1181. URL: https://doi.org/10.1128/aem.70.2.1176-1181.2004 (date of access: 13.10.2022).

48. REGULATION O. COMMISSION REGULATION (EC) No 429/2008 of 25 April 2008 on detailed rules for the implementation of Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the preparation and the presentation of applications and the assessment and the authorisation of feed additives. *Official J Eur Union*, 2008, 0001-0065.

49. Mohanty J. N., Das P. K., Nanda S. Comparative analysis of crude and pure lactic acid produced by *Lactobacillus fermentum* and its inhibitory effects on spoilage bacteria. *The Pharma Innovation Journal*. 2015. No. 3. P. 38–42.

50. Comparative genomics of *Lactobacillus brevis* reveals a significant plasmidome overlap of brewery and insect isolates / M. E. Fraunhofer et al. *Curr. Microbiol*. 2019. No. 76. P. 37–47.

51. Comparative genomics of *Lactobacillus sakei* supports the development of starter strain combinations / L. Eisenbach et al. *Microbiological Research*. 2019. Vol. 221. P. 1–9. URL: https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.01.001 (date of access: 14.10.2022).

52. Comparative genomics of *Lactobacillus salivarius* strains focusing on their host adaptation / J.-Y. Lee et al. *Microbiological Research*. 2017. Vol. 205. P. 48–58. URL: https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.008 (date of access: 14.10.2022).

53. Comparative Genomics of the Genus *Lactobacillus* Reveals Robust Phylogroups That Provide the Basis for Reclassification / E. Salvetti et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018. Vol. 84, no. 17. URL: https://doi.org/10.1128/aem.00993-18 (date of access: 14.10.2022).

54. Comparative genomics of the lactic acid bacteria / K. Makarova et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103, no. 42. P. 15611–15616. URL: https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103 (date of access: 14.10.2022).

55. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species / A. N. Vlasova et al. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2016. Vol. 172. P. 72–84. URL: https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.01.003 (date of access: 14.10.2022).

56. Complete Genome Sequence of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 / H. Morita et al. *Journal of Bacteriology*. 2009. Vol. 191, no. 24. P. 7630–7631. URL: https://doi.org/10.1128/jb.01287-09 (date of access: 14.10.2022).

57. Council of the European Communities Council Directive of 26 November 1990 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. 90/679/EEC. *Official Journal of the European Communities*. 1990. №374. P. 1–12.

58. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models / A. K. DeGruttola et al. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2016. Vol. 22, no. 5. P. 1137–1150. URL: https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000750 (date of access: 14.10.2022).

59. Das T., Gireesh T., Shankar P. A. Identification of lactobacilli producing antibacterial compounds isolated from animals and chicken. *IndianJ Dairy Bio Sci*. 1997. No. 8. 10–13.

60. Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications / F. Bäckhed et al. *Cell Host & Microbe*. 2012. Vol. 12, no. 5. P. 611–622. URL: https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012 (date of access: 14.10.2022).

61. Dellaglio F., Felis G. E., Torriani S. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. United Kingdom, 2005. P. 25–49.

62. Devereux R., Willis S. G. Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular microbial ecology manual*. Dordrecht, 1995. P. 277–287.

63. Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety / ed. by D. Di Gioia, B. Biavati. Cham : Springer International Publishing, 2018. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-71950-4 (date of access: 14.10.2022).

64. Dicks L., Botes M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*. 2010. Vol. 1, no. 1. P. 11–29. URL: https://doi.org/10.3920/bm2009.0012 (date of access: 14.10.2022).

65. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10−/− mice / S. Devkota et al. *Nature*. 2012. Vol. 487, no. 7405. P. 104–108. URL: https://doi.org/10.1038/nature11225 (date of access: 14.10.2022).

66. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis / E. Tacconelli et al. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018. Vol. 18, no. 3. P. 318–327. URL: https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30753-3 (date of access: 14.10.2022).

67. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota / C. A. Lozupone et al. *Nature*. 2012. Vol. 489, no. 7415. P. 220–230. URL: https://doi.org/10.1038/nature11550 (date of access: 14.10.2022).

68. Savage D. C. Gastrointestinal Microflora in Mammalian Nutrition. *Annual Review of Nutrition*. 1986. Vol. 6, no. 1. P. 155–178. URL: https://doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.001103 (date of access: 14.10.2022).

69. Dysbiosis and the immune system / M. Levy et al. *Nature Reviews Immunology*. 2017. Vol. 17, no. 4. P. 219–232. URL: https://doi.org/10.1038/nri.2017.7 (date of access: 14.10.2022).

70. Dysbiosis associated with acute helminth infections in herbivorous youngstock – observations and implications / L. E. Peachey et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-019-47204-6 (date of access: 14.10.2022).

71. Elmer G., Mc Farland L., Surawicz C. M. Biotherapeutic agents and i nfection diseases. New York : Human Press, 1999. 316 p.

72. Eady S. J., Garreau H., Gilmour A. R. Heritability of resistance to bacterial infection in meat rabbits. *Livestock Science*. 2007. Vol. 112, no. 1-2. P. 90–98. URL: https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.158 (date of access: 14.10.2022).

73. Effect of dietary supplementation of probiotic and prebiotic on preventing post weaning digestive disorders and productive performance of growing rabbits / K. H. Amber et al. *Egyptian Poultry Science Journal*. 2014. No. 34. P. 19–38.

74. Effect of postnatal low-dose exposure to environmental chemicals on the gut microbiome in a rodent model / J. Hu et al. *Microbiome*. 2016. Vol. 4, no. 1. URL: https://doi.org/10.1186/s40168-016-0173-2 (date of access: 14.10.2022).

75. Matusevicius P., Asmenskaite L., Zilinskiene A. Effect of probiotic Bioplus 2B® on performance of growing rabbit. *Veterinarija Ir Zootechnika*. 2006. No. 36. P. 54–59.

76. Effect of probiotic Ecobiol on broiler performance / A. Ortiz et al. *19th European Symposium on Poultry Nutrition*.

77. Effective role of microorganisms in livestock development / D. R. Gunturu et al. *In Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. 2019. P. 185–194.

78. Effects of Age and Dietary Fibre Level on Caecal Microbial Communities of Conventional and Specific Pathogen-Free Rabbits / N. Bennegadi et al. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2003. Vol. 15, no. 1. P. 23–32. URL: https://doi.org/10.1080/08910600310015574 (date of access: 14.10.2022).

79. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens / S. T. Ahmed et al. *Poultry Science*. 2014. Vol. 93, no. 8. P. 1963–1971. URL: https://doi.org/10.3382/ps.2013-03718 (date of access: 14.10.2022).

80. Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens / A. T. Hung et al. *Animal Production Science*. 2012. Vol. 52, no. 9. P. 874. URL: https://doi.org/10.1071/an11332 (date of access: 14.10.2022).

81. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens / X. Zhao et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97, no. 14. P. 6477–6488. URL: https://doi.org/10.1007/s00253-013-4970-2 (date of access: 14.10.2022).

82. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens / S. Mookiah et al. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013. Vol. 94, no. 2. P. 341–348. URL: https://doi.org/10.1002/jsfa.6365 (date of access: 14.10.2022).

83. Effects of environmental pollutants on gut microbiota / Y. Jin et al. *Environmental Pollution*. 2017. Vol. 222. P. 1–9. URL: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.045 (date of access: 14.10.2022).

84. Effects of feed additives on body weights at different ages in rabbit / A. K. Shrivastava et al. *Scholarly Journal of Agricultural Science*. 2012. No. 2. P. 277–282.

85. Effects of probiotics and enzymes on growth performance and haematobiochemical parameters in broilers / M. Rahman et al. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 2013. No. 11. P. 111–118.

86. Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens / S. P. Bai et al. *Poultry Science*. 2013. Vol. 92, no. 3. P. 663–670. URL: https://doi.org/10.3382/ps.2012-02813 (date of access: 14.10.2022).

87. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal*. 2009. Vol. 7, no. 11. P. 1372. URL: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1372 (date of access: 14.10.2022).

88. El-deek A. A., Albanoby M. A., Abou El-Naga M. K. El-deek A. A. Evaluation of super action probiotic as a natural growth promoter for growing rabbits. *Egyptian Poultry Science Journal*. 2013. No. 33. P. 407–419.

89. El-Sagheer M., Hassanein H. H. M. El-Sagheer M. Effect of enzymes and probiotic mixture supplementation to the diet of growing female rabbits on performance and carcass criteria. *Egyptian Poultry Science Journal*. 2014. No. 34. P. 259–272.

90. Pessione E. Interactive Probiotics. Taylor & Francis Group, 2014. 274 p.

91. Enterococcus faecium CCM7420, bacteriocin PPB CCM7420 and their effect in the digestive tract of rabbits / M. Pogány Simonová et al. *Czech Journal of Animal science*. 2009. No. 54. P. 376–386.

92. Enzootic Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in laboratory rabbits / A. G. Swennes et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012. Vol. 50, no. 7.

P. 2353–2358. URL: https://doi.org/10.1128/jcm.00832-12 (date of access: 14.10.2022).

93. Estimation of probiotics by infection model of infant rabbit with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 / T. Tachikawa et al. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*. 1998. Vol. 72, no. 12. P. 1300–1305. URL: https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.72.1300 (date of access: 14.10.2022).

94. Evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic lactic acid bacteria strains isolated from meat products / I. Moreno et al. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2018. Vol. 10, no. 4. P. 762–774. URL: https://doi.org/10.1007/s12602-018-9388-9 (date of access: 14.10.2022).

95. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model / D. J. Lee et al. *Pediatric Surgery International*. 2000. Vol. 16, no. 4. P. 237–242. URL: https://doi.org/10.1007/s003830050736 (date of access: 14.10.2022).

96. Ewuola E. O., Amadi C. U., Imam T. K. Performance evaluation and nutrient digestibility of rabbits fed dietary prebiotics, probiotics and symbiotic. *International Journal of Applied Agricultural and Apicultural Research*. 2011. No. 7. P. 107–117.

97. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera / Z. Sun et al. *Nature Communications*. 2015. Vol. 6, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/ncomms9322 (date of access: 14.10.2022).

98. Exposure to heat-stress environment affects the physiology, circulation levels of cytokines, and microbiome in dairy cows / S. Chen et al. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-018-32886-1 (date of access: 14.10.2022).

99. Features of *Lactobacillus sakei* isolated from Italian sausages: focus on strains from Ventricina del Vastese / C. Amadoro et al. *Italian Journal of Food Safety*. 2015. Vol. 4, no. 4. URL: https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5449 (date of access: 14.10.2022).

100. Felis G. E., Dellaglio F. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 2007. No. 8. P. 44–61.

101. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters / C. Alexopoulos et al. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2004. Vol. 88, no. 11-12. P. 381–392. URL: https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2004.00492.x (date of access: 14.10.2022).

102. Fijan S., Šulc D., Steyer A. Study of the *in vitro* antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018. Vol. 15, no. 7. P. 1539. URL: https://doi.org/10.3390/ijerph15071539 (date of access: 14.10.2022).

103. Finegold S. M. Intestinal bacteria. The role they play in normal physiology, pathologic physiology, and infection. *California medicine*. 1969. No. 110. P. 455–459.

104. Finegold S. M., Sutter V. L., Mathisen G. E. Normal indigenous intestinal flora. *Human intestinal microflora in health and disease*. 1983. P. 27–32.

105. Fortun-Lamothe L., Boullier S. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science*. 2007. Vol. 107, no. 1. P. 1–18. URL: https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.09.005 (date of access: 14.10.2022).

106. Fremaux C. Yann H., Cenatiempo Y. Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology*. 1995. Vol. 141, no. 7. P. 1637-1645.

107. Probiotics: the scientific basis / ed. by R. Fuller. Edinburgh : Springer Science & Business Media, 2012. 398 p.

108. Fuller R. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*. 1989. No. 67. P. 365–378.

109. Genus Lactobacillus. *LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. URL: https://lpsn.dsmz.de/genus/lactobacillus (date of access: 14.10.2022).

110. Gevers D., Huys G., Swings J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003. Vol. 225, no. 1. P. 125–130. URL: https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00505-6 (date of access: 14.10.2022).

111. Global trends in antimicrobial use in food animals / T. P. Van Boeckel et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Vol. 112, no. 18. P. 5649–5654. URL: https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112 (date of access: 14.10.2022).

112. Gouet P. H., Fonty G. Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Ann Biol Anita Biochem Biophys*. 1979. No. 19. P. 553–566.

113. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli / W. P. CHARTERIS et al. *Journal of Food Protection*. 2001. Vol. 64, no. 12. P. 2007–2014. URL: https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.12.2007 (date of access: 14.10.2022).

114. Growth performance and nutrient digestibility of weaned rabbits fed diets supplemented with varying levels of baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) / B. M. Shehu et al. *Journal of Agricultural and Rural Development*. 2014. No. 17. P. 1619–1627.

115. Guarner F., Malagelada J.-R. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 2003. Vol. 361, no. 9356. P. 512–519. URL: https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)12489-0 (date of access: 14.10.2022).

116. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms / G. Rychen et al. *EFSA Journal*. 2018. Vol. 16, no. 3. URL: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206 (date of access: 14.10.2022).

117. Guillot J. F. Probiotic feed additives. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2003. No. 26. P. 52–55.

118. Gulahmadov S. G. Isolation and identification of lactic acid bacteria from some Azerbaijani yogurts. *Труды института микробиологии НАН Азербайджана*. 2008. Vol. 4, no. 6. P. 156–162.

119. Gulahmadov S., Abdullaeva N., Kuliev A. Isolation and genotypic charac-terization of lactic acid bacteria from some Azerbaijani dairy products. *Materials of III International Young Scientist conference «Biodiversity. Ecology.Adap-tation.Evolution»*, Odesa. 2007. P. 190.

120. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components / I. Rowland et al. *European Journal of Nutrition*. 2017. Vol. 57, no. 1. P. 1–24. URL: https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8 (date of access: 14.10.2022).

121. Gut microbiota may predict host divergence time during Glires evolution / H. Li et al. *FEMS Microbiology Ecology*. 2017. P. fix009. URL: https://doi.org/10.1093/femsec/fix009 (date of access: 14.10.2022).

122. Gut microbiota profiling with differential tolerance against the reduced dietary fibre level in rabbit / S.-Y. Chen et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-018-36534-6 (date of access: 14.10.2022).

123. Haligur M., Ozmen O., Demir N. Pathological and Ultrastructural Studies on Mucoid Enteropathy in New Zealand Rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2009. Vol. 18, no. 3. P. 224–228. URL: https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.06.006 (date of access: 14.10.2022).

124. The antibacterial activity of acetic acid against biofilm-producing pathogens of relevance to burns patients / F. D. Halstead et al. *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, no. 9. P. e0136190. URL: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136190 (date of access: 14.10.2022).

125. Hammes W. P., Vogel R. F. The genera of lactic acid bacteria. *Blackie Academic & Professional*. 1995. P. 628–631.

126. Hammes W. P., Hertel C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The prokaryotes*. New York, 2006. P. 320–403.

127. Hamrany M., Balherby M., Bepro H. Use of *Lactobacillus plantarum* „BJ 0021” in growing local rabbit rationss, under Algerian conditions. *1st Intern. Conf. on Indigenous versus Acclimatized Rabbits: El-Arish–North Sinai (Egypt). World Rabbit Sci.–North Sinai (Egypt)World Rabbit Sci*. P. 48.

128. Harcourt-Brown F. Textbook of rabbit medicine. Oxford (UK): Alden Press, 2002. 284 p.

129. Heinl S., Grabherr R. Systems biology of robustness and flexibility: *Lactobacillus buchneri* –A show case. *Journal of Biotechnology*. 2017. Vol. 257. P. 61–69. URL: https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.007 (date of access: 14.10.2022).

130. Henriksson P. J. G., Troell M., Rico A. Antimicrobial use in aquaculture: Some complementing facts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Vol. 112, no. 26. P. E3317. URL: https://doi.org/10.1073/pnas.1508952112 (date of access: 14.10.2022).

131. Hernández D., Cardell E., Zárate V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced byLactobacillus plantarumTF711. *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99, no. 1. P. 77–84. URL: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02576.x (date of access: 15.10.2022).

132. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease / A. W. Walker et al. *BMC Microbiology*. 2011. Vol. 11, no. 1. P. 7. URL: https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-7 (date of access: 15.10.2022).

133. Holzapfel W. H., Geisen R., Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 1995. Vol. 24, no. 3. P. 343–362. URL: https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00036-6 (date of access: 15.10.2022).

134. Hooper L. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology*. 2004. Vol. 12, no. 3. P. 129–134. URL: https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.01.001 (date of access: 15.10.2022).

135. Hooper L. V., Littman D. R., Macpherson A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*. 2012. Vol. 336, no. 6086. P. 1268–1273. URL: https://doi.org/10.1126/science.1223490 (date of access: 15.10.2022).

136. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria / G. V. de Melo Pereira et al. *Biotechnology Advances*. 2018. Vol. 36, no. 8. P. 2060–2076. URL: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003 (date of access: 15.10.2022).

137. Antibiotic growth-promoters in food animals. *FAO Animal Production and Health Paper*. 160th ed. Rome, 2004. P. 129–152.

138. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation / Y. Liu et al. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010. Vol. 299, no. 5. P. G1087–G1096. URL: https://doi.org/10.1152/ajpgi.00124.2010 (date of access: 15.10.2022).

139. Identification, characterization, immobilization, and mutational analysis of a novel acetylesterase with industrial potential (La AcE) from *Lactobacillus acidophilus* / Y. Wang et al. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2018. Vol. 1862, no. 1. P. 197–210. URL: https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.10.008 (date of access: 15.10.2022).

140. IgA regulates the composition and metabolic function of gut microbiota by promoting symbiosis between bacteria / A. Nakajima et al. *Journal of Experimental Medicine*. 2018. Vol. 215, no. 8. P. 2019–2034. URL: https://doi.org/10.1084/jem.20180427 (date of access: 15.10.2022).

141. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92 / J. Frece et al. *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 98, no. 2. P. 285–292. URL: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02473.x (date of access: 15.10.2022).

142. *In vitro* antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens / V. Klose et al. *Veterinary Microbiology*. 2010. Vol. 144, no. 3-4. P. 515–521. URL: https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.025 (date of access: 15.10.2022).

143. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese / S. N. Casarotti et al. *Annals of Microbiology*. 2017. Vol. 67, no. 4. P. 289–301. URL: https://doi.org/10.1007/s13213-017-1258-2 (date of access: 15.10.2022).

144. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. / V. G. Eijsink et al. *Journal of bacteriology*. 1996. Vol. 178, no. 8. P. 2232–2237. URL: https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2232-2237.1996 (date of access: 15.10.2022).

145. Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time / M. Daşkıran et al. *Journal of Applied Poultry Research*. 2012. Vol. 21, no. 3. P. 612–622. URL: https://doi.org/10.3382/japr.2011-00512 (date of access: 15.10.2022).

146. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice / C. Zhang et al. *The ISME Journal*. 2009. Vol. 4, no. 2. P. 232–241. URL: https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112 (date of access: 15.10.2022).

147. Interplay Between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents / A. Santacruz et al. *Obesity*. 2009. Vol. 17, no. 10. P. 1906–1915. URL: https://doi.org/10.1038/oby.2009.112 (date of access: 15.10.2022).

148. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in clostridium difficile infection and nosocomial diarrhea / V. C. Antharam et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013. Vol. 51, no. 9. P. 2884–2892. URL: https://doi.org/10.1128/jcm.00845-13 (date of access: 15.10.2022).

149. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term ige levels / J. Cahenzli et al. *Cell Host & Microbe*. 2013. Vol. 14, no. 5. P. 559–570. URL: https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.10.004 (date of access: 15.10.2022).

150. Intestinal microflora and metabolic diseases / M. Serino et al. *Diabetes & Metabolism*. 2009. Vol. 35, no. 4. P. 262–272. URL: https://doi.org/10.1016/j.diabet.2009.03.003 (date of access: 15.10.2022).

151. Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by Its Exopolysaccharide / M. Feng et al. *Journal of Food Science*. 2012. Vol. 77, no. 6. P. T111–T117. URL: https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02734.x (date of access: 15.10.2022).

152. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens / M. Rafieian-Kopaei et al. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2017. Vol. 7, no. 3. P. 137. URL: https://doi.org/10.4103/jphi.jphi_8_17 (date of access: 15.10.2022).

153. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production / Y. García-Hernández et al. *Research in Veterinary Science*. 2016. Vol. 108. P. 125–132. URL: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.009 (date of access: 15.10.2022).

154. Iwu C. J., Iwu I. M., Aguihe P. C. Technical efficiency of fish farms in borgu local government area, Niger State, Nigeria. *International Journal of Applied Research and Technology*. 2015. No. 4. P. 116–120.

155. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* Group / J. L. JOHNSON et al. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1980. Vol. 30, no. 1. P. 53–68. URL: https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-53 (date of access: 15.10.2022).

156. Jose N., Bunt C., Hussain M. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*. 2015. Vol. 3, no. 2. P. 198–212. URL: https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198 (date of access: 15.10.2022).

157. Jose N. M., Bunt C. R., Hussain M. A. Implications of antibiotic resistance in probiotics. *Food Reviews International*. 2014. Vol. 31, no. 1. P. 52–62. URL: https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961075 (date of access: 15.10.2022).

158. Kandler O. Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Baltimore, 1986. P. 1063–1065.

159. Khalid K. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*. 2011. Vol. 1, no. 3. P. 1–13.

160. Kim B.-S., Jeon Y.-S., Chun J. Current Status and Future Promise of the Human Microbiome. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*. 2013. Vol. 16, no. 2. P. 71. URL: https://doi.org/10.5223/pghn.2013.16.2.71 (date of access: 15.10.2022).

161. Krishnan S., Alden N., Lee K. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015. Vol. 36. P. 137–145. URL: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.015 (date of access: 15.10.2022).

162. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy / ed. by W. Holzapfel, B. Wood. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. 606 p.

163. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. lactis and ssp. bulgaricus: a chronicle of evolution in action / H. El Kafsi et al. *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15, no. 1. P. 407. URL: https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-407 (date of access: 15.10.2022).

164. *Lactobacillus* strains and methods of selection: Patent No. US4839281A U.S.: US4839281A priorities 17.04.85; publication 13.06.89 Patent and Trademark Office.

165. Lam P. T., Jamikorn U. The effects of probiotics supplement (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*) on feed efficiency, growth performance and fecal consistency index of weaning rabbits. *In Proceedings of the 50th Kasetsart University Annual Conference* : Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, 31 January – 2 February 2012. P. 136–143.

166. Langhendries J. P. Early bacterial colonisation of the intestine: why it matters. *Italian Journal of Pediatrics*. 2005. Vol. 6, no. 31. P. 360–369.

167. Laparra J. M., Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*. 2010. Vol. 61, no. 3. P. 219–225. URL: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.001 (date of access: 15.10.2022).

168. Lara L., Rostagno M. Impact of heat stress on poultry production. *Animals*. 2013. Vol. 3, no. 2. P. 356–369. URL: https://doi.org/10.3390/ani3020356 (date of access: 15.10.2022).

169. Lederberg J., McCray A. T. Ome SweetOmics-A genealogical treasury of words. *The scientist*. 2001. Vol. 15, no. 7. P. 8–10.

170. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA / M. Tamminen et al. *Letters in Applied Microbiology*. 2004. Vol. 39, no. 5. P. 439–444. URL: https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01607.x (date of access: 15.10.2022).

171. Liepa L., Viduža M. The effect of peroral administration of *Lactobacillus fermentum* culture on dairy cows health indices. *Macedonian Veterinary Review*. 2018. Vol. 41, no. 2. P. 143–151.

172. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products / W.-H. Lin et al. *Food Microbiology*. 2006. Vol. 23, no. 1. P. 74–81. URL: https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.013 (date of access: 15.10.2022).

173. Lindgren S. E., Dobrogosz W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*. 1990. Vol. 87, no. 1-2. P. 149–164. URL: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04885.x (date of access: 15.10.2022).

174. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action / E. Linley et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012. Vol. 67, no. 7. P. 1589–1596. URL: https://doi.org/10.1093/jac/dks129 (date of access: 15.10.2022).

175. A L., T W. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2006. No. 7. P. 73–89.

176. Makled M. N. The potentials of probiotics in poultry feeds. *In A review 3rd Scientific Symp. for Animal Poultry and Fish Nutrition*, Kafr-EL-Sheikh. 1991. P. 54–68.

177. Maldonado A., Ruiz-Barba J. L., Jim nez-Daz R. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Archives of Microbiology*. 2004. Vol. 181, no. 1. P. 8–16. URL: https://doi.org/10.1007/s00203-003-0606-8 (date of access: 15.10.2022).

178. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications / P. S. Chauhan et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 93, no. 5. P. 1817–1830. URL: https://doi.org/10.1007/s00253-012-3887-5 (date of access: 15.10.2022).

179. Marchesi J. The human microbiota and microbiome. Cardiff University : UK.: CABI, 2014. 208 p.

180. Marhamatizadeh M. H., Sayyadi S. Mining of lactic acid bacteria from traditional yogurt (Mast) of Iran for possible industrial probiotic use. *Italian Journal of Animal Science*. 2019. Vol. 18, no. 1. P. 663–667. URL: https://doi.org/10.1080/1828051x.2018.1552541 (date of access: 15.10.2022).

181. Markowiak P., Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*. 2018. Vol. 10, no. 1. URL: https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0 (date of access: 15.10.2022).

182. Matsuoka K., Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathology*. 2014. Vol. 37, no. 1. P. 47–55. URL: https://doi.org/10.1007/s00281-014-0454-4 (date of access: 15.10.2022).

183. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances / S. C. Ng et al. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009. Vol. 15, no. 2. P. 300–310. URL: https://doi.org/10.1002/ibd.20602 (date of access: 15.10.2022).

184. Metabolic profiling of sourdough fermented wheat and rye bread / V. M. Koistinen et al. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-018-24149-w (date of access: 15.10.2022).

185. Millette M., Luquet F. M., Lacroix M. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*. 2007. Vol. 44, no. 3. P. 314–319. URL: https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.02060.x (date of access: 15.10.2022).

186. Mingmongkolchai S., Panbangred W. Bacillusprobiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*. 2018. Vol. 124, no. 6. P. 1334–1346. URL: https://doi.org/10.1111/jam.13690 (date of access: 15.10.2022).

187. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008. URL: https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26242 (date of access: 15.10.2022).

188. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum / L. Abecia et al. *FEMS Microbiology Letters*. 2005. Vol. 244, no. 1. P. 111–115. URL: https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.028 (date of access: 15.10.2022).

189. Monnet D. L. Toward multinational antimicrobial resistance surveillance systems in Europe. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000. Vol. 15, no. 2. P. 91–101. URL: https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00148-5 (date of access: 15.10.2022).

190. In vitro evaluation of *Lactobacillus plantarum* as direct-fed microbials in high-producing dairy cows diets / H. F. Monteiro et al. *Translational Animal Science*. 2019. Vol. 4, no. 1. P. 214–228. URL: https://doi.org/10.1093/tas/txz187 (date of access: 15.10.2022).

191. Mu Q., Tavella V. J., Luo X. M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in microbiology*. URL: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00757/full.

192. Nissle A. Über die Grundlagen einer neuen ursachlichen Bekampfung der pathologischen Darmflora. *Dtsch Med Wochenschr*. 1916. No. 42. P. 1181–1184.

193. Onu P. N., Oboke S. A. Evaluation of enzyme and probiotic supplementation of maize processing waste-based diets on performance and nutrient

utilization of weaner rabbits. *Indian Journal of Animal Research*. 2010. Vol. 44, no. 2. P. 87–93.

194. Oren A., Garrity G. M. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 68, part 1, of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018. Vol. 68, no. 4. P. 979–981.

195. Orla-Jensen S. The lactic acid bacteria. 2nd ed. K©ıbenhavn : E. Munksgaard, 1942. 118 p.

196. Overview of gut flora and probiotics / W. H. Holzapfel et al. *International Journal of Food Microbiology*. 1998. Vol. 41, no. 2. P. 85–101. URL: https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00044-0 (date of access: 15.10.2022).

197. Pamer E. G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*. 2016. Vol. 352, no. 6285. P. 535–538. URL: https://doi.org/10.1126/science.aad9382 (date of access: 15.10.2022).

198. Petersen C., Round J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*. 2014. Vol. 16, no. 7. P. 1024–1033. URL: https://doi.org/10.1111/cmi.12308 (date of access: 15.10.2022).

199. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches / R. J. Siezen et al. *Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 12, no. 3. P. 758–773. URL: https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02119.x (date of access: 15.10.2022).

200. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA / M. D. Collins et al. *FEMS Microbiology Letters*. 1991. Vol. 77, no. 1. P. 5–12. URL: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04313.x (date of access: 15.10.2022).

201. Pineiro M., Stanton C. Probiotic Bacteria: Legislative Framework–Requirements to Evidence Basis. *The Journal of Nutrition*. 2007. Vol. 137, no. 3. P. 850S–853S. URL: https://doi.org/10.1093/jn/137.3.850s (date of access: 15.10.2022).

202. Pokusaeva K., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*. 2011. Vol. 6, no. 3. P. 285–306. URL: https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6 (date of access: 15.10.2022).

203. Polak-Berecka M. Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surfase metodology / M. Polak-Berecka et al. *Polish J. Microbiol.* 2010. Vol. 59, no. 2. P. 113–118.

204. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. / P. Vandamme et al. *Microbiological reviews*. 1996. Vol. 60, no. 2. P. 407–438. URL: https://doi.org/10.1128/mr.60.2.407-438.1996 (date of access: 15.10.2022).

205. Popova T. Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. *Current Opinion in Food Science*. 2017. Vol. 14. P. 72–77. URL: https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.008 (date of access: 15.10.2022).

206. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity / S. Combes et al. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011. Vol. 77, no. 3. P. 680–689. URL: https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01148.x (date of access: 15.10.2022).

207. The potential impact of the *Lactobacillus* name change: The results of an expert meeting organised by the Lactic Acid Bacteria Industrial Platform (LABIP) / B. Pot et al. *Trends in Food Science & Technology*. 2019. Vol. 94. P. 105–113. URL: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.006 (date of access: 15.10.2022).

208. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains / P. Shokryazdan et al. *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. P. 1–16. URL: https://doi.org/10.1155/2014/927268 (date of access: 15.10.2022).

209. Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition / S. Suvarna et al. *Food Science and Biotechnology*. 2018. Vol. 27, no. 3. P. 745–753. URL: https://doi.org/10.1007/s10068-018-0310-8 (date of access: 15.10.2022).

210. Prevalence and characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* with the eae gene in diarrhoeic rabbits / J. E. Blanco et al. *Microbiol Immunol*. 1997. No. 41. P. 77–82.

211. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in Canadian commercial meat, companion, laboratory, and shelter rabbits (Oryctolagus cuniculus) and its association with routine antimicrobial use in commercial meat rabbits / J. Kylie et al. *Preventive Veterinary Medicine*. 2017. Vol. 147. P. 53–57. URL: https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.09.004 (date of access: 15.10.2022).

212. Probiotic characters of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends / M. Papizadeh et al. *Microbial Pathogenesis*. 2017. Vol. 111. P. 118–131. URL: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.021 (date of access: 15.10.2022).

213. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products / P. A. Maragkoudakis et al. *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, no. 3. P. 189–199. URL: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009 (date of access: 15.10.2022).

214. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from sorghum-based traditional fermented food / K. Poornachandra Rao et al. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2015. Vol. 7, no. 2. P. 146–156. URL: https://doi.org/10.1007/s12602-015-9186-6 (date of access: 15.10.2022).

215. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains / P. Shokryazdan et al. *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014. P. 1–16. URL: https://doi.org/10.1155/2014/927268 (date of access: 15.10.2022).

216. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials / C. Dunne et al. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. 1999. No. 76. P. 279–292.

217. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. / T. L. Talarico et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

1988. Vol. 32, no. 12. P. 1854–1858. URL: https://doi.org/10.1128/aac.32.12.1854 (date of access: 15.10.2022).

218. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria strains isolated from traditional, starter-free dairy products made of raw milk / J. A. Valenzuela et al. *Beneficial Microbes*. 2019. Vol. 10, no. 5. P. 579–587. URL: https://doi.org/10.3920/bm2018.0176 (date of access: 15.10.2022).

219. Profiling of metabolome and bacterial community dynamics in ensiled Medicago sativa inoculated without or with *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus buchneri* / X. S. Guo et al. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-017-18348-0 (date of access: 15.10.2022).

220. Rabbit Advocacy Network's Work on the Rabbit Meat Issue | House Rabbit Society. *House Rabbit Society*. URL: https://rabbit.org/rabbit-advocacy-networks-work-on-the-rabbit-meat-issue/ (date of access: 15.10.2022).

221. Rabbit microbiota changes throughout the intestinal tract / M. Velasco-Galilea et al. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. URL: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02144 (date of access: 15.10.2022).

222. Rada V., Sirotek K., Petr J. Evaluation of Selective Media for bifidobacteria in poultry and rabbit caecal samples. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 1999. Vol. 46, no. 6. P. 369–373. URL: https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.1999.00241.x (date of access: 15.10.2022).

223. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. EUR-Lex - 32003R1831 - EN - EUR-Lex. *EUR-Lex – Access to European Union law – choose your language*. URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2003/1831/oj (date of access: 15.10.2022).

224. Relationship between diet, composition of intestinal microbiota and intestinal metabolism / H. J. Flint et al. *Proceedings of the Food Society*. 2015. No. 74. P. 13–22.

225. Rojas M., Ascencio F., Conway P. L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small

intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. Vol. 68, no. 5. P. 2330–2336. URL: https://doi.org/10.1128/aem.68.5.2330-2336.2002 (date of access: 15.10.2022).

226. Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen / A. K. Yadav et al. *Microbiological Research*. 2013. Vol. 168, no. 10. P. 639–645. URL: https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.05.003 (date of access: 15.10.2022).

227. Jandhyala S. M. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*. 2015. Vol. 21, no. 29. P. 8787. URL: https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787 (date of access: 15.10.2022).

228. Rolfe R. D. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. *Clinical Infectious Diseases*. 1984. Vol. 6, Supplement_1. P. S73–S79. URL: https://doi.org/10.1093/clinids/6.supplement_1.s73 (date of access: 15.10.2022).

229. Rosenfeld C. S. Gut Dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017. Vol. 7. URL: https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00396 (date of access: 15.10.2022).

230. Sahadeva P. K., Leong R. S. F., Chua K. H. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*. 2011. Vol. 18, no. 4. P. 1515–1522.

231. Sakandar H. A., Kubow S., Sadiq F. A. Isolation and *in vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT*. 2019. Vol. 104. P. 70–75. URL: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.038 (date of access: 15.10.2022).

232. Salvetti E., Torriani S., Felis G. E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2012. Vol. 4, no. 4. P. 217–226. URL: https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8 (date of access: 15.10.2022).

233. Sanders expert consensus document: the International scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / C. Hill et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014. No. 11. P. 506–514.

234. Schiffrin E. J., Marteau P., Brassart D. Intestinal Microbiota in Health and Disease: Modern Concepts. Taylor & Francis Group, 2014. 344 p.

235. Schleifer K. H., Ludwig W. Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. *Systematic and Applied Microbiology*. 1995. Vol. 18, no. 4. P. 461–467. URL: https://doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80404-2 (date of access: 15.10.2022).

236. Screening of antagonistic activity of probiotic bacteria against some food-borne pathogens / A. M. El-Kholy et al. *J. Appl. Environ. Microbiol*. 2014. No. 2. P. 53–60.

237. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity / M. G. Shehata et al. *Annals of Agricultural Sciences*. 2016. Vol. 61, no. 1. P. 65–75. URL: https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.03.001 (date of access: 15.10.2022).

238. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli* / X. Liu et al. *Food Control*. 2013. Vol. 30, no. 2. P. 563–568. URL: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.002 (date of access: 15.10.2022).

239. Screening of microorganism symbiont strains as a base of probiotics for poultry industry / A. G. Koshchaev et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017. No. 9. P. 1373–1379.

240. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans / C. N. Jacobsen et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. Vol. 65, no. 11. P. 4949–4956. URL: https://doi.org/10.1128/aem.65.11.4949-4956.1999 (date of access: 15.10.2022).

241. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned

piglets / R. Dowarah et al. *PLOS ONE*. 2018. Vol. 13, no. 3. P. e0192978. URL: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192978 (date of access: 15.10.2022).

242. Sengupta S., Chattopadhyay M. K., Grossart H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*. 2013. Vol. 4. URL: https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047 (date of access: 15.10.2022).

243. Shah N. P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83, no. 4. P. 894–907. URL: https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(00)74953-8 (date of access: 15.10.2022).

244. Shehata A. S., Tawfeek M. I. Probiotics as feed additives in rabbits. *In the 6th international conference on rabbit production in hot climate*, Assuit. 2010. P. 455–471.

245. Smith H. W. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J Path Bact*. 1965. No. 90. P. 495–513.

246. Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR withpepC,pepN andhtrA targeted primers / M. G. Fortina et al. *FEMS Microbiology Letters*. 2001. Vol. 198, no. 1. P. 85–89. URL: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10623.x (date of access: 15.10.2022).

247. Stefanovic E., Fitzgerald G., McAuliffe O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiology*. 2017. Vol. 61. P. 33–49. URL: https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009 (date of access: 15.10.2022).

248. Stephen W. B. Barthold S. W., Percy D. H., Griffey S. M. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. Wiley & Sons, Incorporated, John, 2016. 384 p.

249. Stoyanova L. G., Ustyugova E. A., Netrusov A. I. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48, no. 3. P. 229–243. URL: https://doi.org/10.1134/s0003683812030143 (date of access: 15.10.2022).

250. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley / D. Bulgarelli et al. *Cell Host & Microbe*. 2015. Vol. 17, no. 3. P. 392–403. URL: https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011 (date of access: 15.10.2022).

251. Studies on the effect of some probiotics in Rabbits / M. Z. El- Dimerdash et al. *Suez Canal Veterinary Medicine Journal*. 2011. No. 16. P. 151–168.

252. Sugiharto S. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2016. Vol. 15, no. 2. P. 99–111. URL: https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001 (date of access: 17.10.2022).

253. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells / K. C. Johnson-Henry et al. *Cellular Microbiology*. 2007. Vol. 9, no. 2. P. 356–367. URL: https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00791.x (date of access: 17.10.2022).

254. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: Selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies / N. Yuki et al. *International Journal of Food Microbiology*. 1999. Vol. 48, no. 1. P. 51–57. URL: https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00029-x (date of access: 17.10.2022).

255. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition / W. H. Holzapfel et al. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001. Vol. 73, no. 2. P. 365s–373s. URL: https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s (date of access: 17.10.2022).

256. Thanh L. P., Jamikorn U. The effects of probiotics supplement (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*) on feed efficiency, growth performance and faecal consistency index of weaning rabbits. *Proceedings of the 50th kasetsart University annual conference*, 31 January – 2 February 2012. 2012. P. 136–143.

257. The domestication of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* - Scientific Reports. *Nature*. URL: https://www.nature.com/articles/srep07202 (date of access: 17.10.2022).

258. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice / P. J. Turnbaugh et al. *Science Translational Medicine*. 2009. Vol. 1, no. 6. P. 6ra14. URL: https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322 (date of access: 17.10.2022).

259. The effects of dietary supplementation of pre-microencapsulated Enterococcus fecalis and the extract of Camellia oleifera seed on growth performance, intestinal morphology, and intestinal mucosal immune functions in broiler chickens / Z. L. Dong et al. *Animal Feed Science and Technology*. 2016. Vol. 212. P. 42–51. URL: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.11.014 (date of access: 17.10.2022).

260. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic / C. Hill et al. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014. Vol. 11, no. 8. P. 506–514. URL: https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66 (date of access: 17.10.2022).

261. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* / X. Chen et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. Vol. 115, no. 3. P. 307–312. URL: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007 (date of access: 17.10.2022).

262. The underlying microbial mechanism of epizootic rabbit enteropathy triggered by a low fiber diet / D. X. Jin et al. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8, no. 1. URL: https://doi.org/10.1038/s41598-018-30178-2 (date of access: 17.10.2022).

263. Tilsala-Timisjärvi A., Alatossava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 1997. Vol. 35, no. 1. P. 49–56. URL: https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)88066-x (date of access: 17.10.2022).

264. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract / A. Reale et al. *LWT - Food Science and Technology*.

2015. Vol. 60, no. 2. P. 721–728. URL: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.022 (date of access: 17.10.2022).

265. Truszczyński M., Pejsak Z. Truszczyński M. Wpływ stosowania u zwierząt antybiotyków na lekooporność bakterii chorobotwórczych dla człowieka. *Med Weter*. 2006. No. 62. P. 1339–1343.

266. Use of probiotics in small animal veterinary medicine / M. C. Jugan et al. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2017. Vol. 250, no. 5. P. 519–528. URL: https://doi.org/10.2460/javma.250.5.519 (date of access: 17.10.2022).

267. Valdés-Varela L., Gueimonde M., Ruas-Madiedo P. 267. Valdés-Varela L. Probiotics for prevention and treatment of Clostridium difficile infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018. P. 161–176.

268. Van Tassell M. L., Miller M. J. *Lactobacillus* Adhesion to Mucus. *Nutrients*. 2011. Vol. 3, no. 5. P. 613–636. URL: https://doi.org/10.3390/nu3050613 (date of access: 17.10.2022).

269. Veeranki S., Tyagi S. C. Dysbiosis and disease: many unknown ends, is it time to formulate guidelines for dysbiosis research?. *Journal of Cellular Physiology*. 2017. Vol. 232, no. 11. P. 2929–2930. URL: https://doi.org/10.1002/jcp.25719 (date of access: 17.10.2022).

270. The effect of *Lactobacillus* isolates on growth performance, immune response, intestinal bacterial community composition of growing Rex Rabbits / C. Wang et al. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2017. Vol. 101, no. 5. P. e1-e13. URL: https://doi.org/10.1111/jpn.12629 (date of access: 17.10.2022).

271. Yeasts in Biotechnology / ed. by T. Peixoto Basso. IntechOpen, 2019. URL: https://doi.org/10.5772/intechopen.77938 (date of access: 17.10.2022).

272. World - rabbit or hare meat -market analysis, forecast, size, trends and insights - IndexBox. *IndexBox - Market Intelligence Platform - 2 Million Reports*. URL: https://www.indexbox.io/blog/which-country-eats-the-most-rabbit-meat-in-the-world/ (date of access: 17.10.2022).

273. Impact of probiotic (*Lactobacillus planterium*) supplementation on productive and physiological performance of growing rabbits under egyptian conditions / A. E. R. El-Shafei et al. *Egyptian Journal of Rabbit Science*. 2019. Vol. 29, no. 1. P. 125–148.

274. Yu A. O., Leveau J. H. J., Marco M. L. Abundance, diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. *Environmental Microbiology Reports*. 2019. Vol. 12, no. 1. P. 16–29. URL: https://doi.org/10.1111/1758-2229.12794 (date of access: 17.10.2022).

275. Effects of drinking water acidification by organic acidifier on growth performance, digestive enzyme activity and caecal bacteria in growing rabbits / K. H. Zhu et al. *Animal Feed Science and Technology*. 2014. Vol. 190. P. 87–94. URL: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.01.014 (date of access: 17.10.2022).

276. Акименко Л. І. Пробіотики у ветеринарній медицині. *Ветеринарна медицина України*. 2005. № 5. С. 37–38.

277. Аксьонов Є. О. Розвиток кролівництва в Україні та світі. *Науково-технічний бюлетень*. 2016. №116. С. 15–21.

278. Асадуллина И. И., Галиуллина А. М. Микробиоценоз кишечника и микробиологические показатели мяса кроликов при ассоциативной болезни и после лечения. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2011. № 4. С. 134–136.

279. Асадуллина И. И. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта кроликов при эймериозе в ассоциации с инфекционным стоматитом и после применения лечебных и корригирующих препаратов. *КиберЛенинка*. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiotsenoz-zheludochno-kishechnogo-trakta-krolikov-pri-eymerioze-v-assotsiatsii-s-infektsionnym-stomatitom-i-posle-primeneniya (дата звернення: 17.10.2022).

280. Ашмарин И. И. Краткое руководство по практической медицинской микробиологии. Ташкент : Медгиз, 1961. 219 с.

281. Бактерії роду *Lactobacillus* у харчовій промисловості (огляд) | Volosyanko | Наукові доповіді НУБіП України / О. В. Волосянко та ін. *Фахові*

видання Національного університету біоресурсів і природокористування України. URL: http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/dopovidi2018.06.023/10635. (дата звернення: 17.10.2022).

282. Банникова Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. Москва : Пищевая промышленность, 1975. 255 с.

283. Барановский А. Ю., Кондрашина Э. А. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника: Краткое руководство. 2-ге вид. Питер : СПб, 2008.

284. Барзашка-Попова С. Н. Коррекция микрофлоры и местного иммунитета кишечника при дисбактериозах с помощью лактобацилл : автореф. автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.09 "инфекционные болезни". Москва, 1990. 24 с.

285. Биологические свойства лактобацилл. Обзор. / О. Волосянко та ін. *Науковий вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва*. 2018. № 293. С. 119–127.

286. Біохімічні показники крові та продуктивні якості кроленят при використанні пробіотика евіталія / В. В. Кулак та ін. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини.* 2017. № 1. С. 142–145.

287. Боднарчук О. Дослідження антагоністичної активності заквасок для кисловершкового масла. *Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького*. 2012. Т. 14, № 2 (52). С. 189–194.

288. Бойко Н., Карганян А., Петенко А. Безпека кормів: біотехнологічні рішення. *Пропозиція*. 2008. № 2. С. 124–136.

289. Борцюх В. В., Шугай М. О. Антимікробні метаболіти молочнокислих бактерій: механізм дії та практичне використання. *Продовольчі ресурси*. 2017. № 9. С. 136–143.

290. Борщ С., Середюк Н., Куцик Р. Вивчення на прикладі E.coli шт. М-17, введеної в препарат біфікол, закономірностей прояву антагоністичних властивостей мікроорганізмів, що належать до різних таксономічних одиниць, є

збудниками дисбактеріозу кишечника, гнійно-запальних процесів та пробіотичними штамами. *Галиц. лікар. вістник.* 2004. № 4. С. 9–11.

291. Бурова О. А. Индекс эндогенной интоксикации как показатель эффективности профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных телят. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2014. № 4. С. 34–38.

292. Василюк О. М., Коваленко Н. К., Гармашева І. Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України. *Мікробіол. журнал*. 2014. № 3. С. 24–31.

293. Вахитов Т. Я. Регуляторные функции бактериальных экзометаболитов на внутрипопуляционном и межвидовых уровнях : автореф. автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук : спец. 03.00.23 "биотехнология". Санкт-Петербург, 2007. 40 с.

294. Ветеринарно-санітарна експертиза з основами технології стандартизації продуктів тваринництва / Н. М. Зажарська та ін. Дніпропетровськ : ДДАУ, 2009. 157 с.

295. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки МВ 9.9.5 – 143 / Л. Некрасова та ін. Київ, 2007. 74 с.

296. Влияние комбикормов, обогащенных пробиотическим комплексом А2, на продуктивные показатели кроликов / Л. И. Лыткина та ін. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2019. № 81. С. 208–217.

297. Влияние пробиотика веткор на мясную продуктивность и морфофункциональную характеристику желудка и печени кроликов / А. В. Востроилов та ін. *Лучшая научная статья*. 2018. С. 29–34.

298. Волкова Е. И., Байматов В. Н. Методы научных исследований в ветеринарии: рек. УМО вузов РФ в качестве учеб. пособия по спец. 111201 "Ветеринария". Москва : КолосС, 2010.

299. Гончар О., Шевченко Є. Перспективи розвитку кролівництва в Україні. *Тваринництво України*. 2011. № 6. С. 2–6.

300. Гончар О. Ф., Бойко О. В., Гавриш О. М. Аналіз стану галузі кролівництва в Україні. *Effective rabbit breeding and fur farming*. 2020. № 6. С. 47–58.

301. Гончарова Г. И. К методике культивирования B. bifidum. *Лабораторное дело*. 1968. № 2. С. 100–102.

302. Грига Н. П., Богдан В. П. Доцільність та необхідність застосування пробіотиків для тварин. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2017. № 18. С. 310–313.

303. Громов Б. В., Павленко Г. В. Экология бактерий: учеб. пособие. Ленинград : ЛГУ, 1989. 246 с.

304. Громова А. В., Ноздрин Г. А., Леляк А. А. Биологический состав микрофлоры кишечника кроликовпороды советская шиншилла в возрастном аспекте. *Вестник НГАУ*. 2016. № 3. С. 54–59.

305. Гужвинська С. О., Палій А. П. Біологічні властивості лактобактерій та біфідобактерій. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. № 32. С. 92–98.

306. Гужвинська С. Відбір молочнокислих бактерій для виготовлення пробіотичних препаратів. *Ветеринарна медицина*. 2014. № 99. С. 196–201.

307. Даниленко С. Г. Дослідження впливу різних факторів на життєздатність молочнокислих бактерій. *Продовольчі ресурси. Серія: Технічні науки*. 2014. С. 130–134.

308. Дансарунова О. С., Алексеева С. М., Цыдыпов В. Ц. Влияние антигельминтиков на возникновение эндогенных бактериальных инфекций животных и пути ее профилактики. *Материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов образовательных и научных учреждений Сибирского и Дальневосточного федеральных округов*, м. Улан-Удэ, 23–25 черв. 2016 р. 2013. С. 34–40.

309. Динамика изменения микрофлоры кишечника белых мышей в условиях эксперимента по АТПМ / О. С. Дансарунова та ін. *Вестник КрасГау*. 2014. № 6. С. 202–205.

310. Дисбактериоз мукозной микрофлоры эзофагогастродуоденальной зоны / В. В. Чернин та ін. Москва : Медицинское информационное агентство, 2011. 146 с.

311. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта и пути их коррекции / Ю. Е. Козловский та ін. *Кролиководство и звероводство*. 2013. № 4. С. 24–28.

312. Коцюмбас І. Я., Малик О. Г., Патерега І. П. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / ред. І. Я. Коцюмбаса. Львів : Тріада плюс, 2006. 360 с.

313. Драгуть С. С. Розповсюдження сальмонельозу, кампілобактеріозу та ієрсиніозу в Україні та країнах ЄС. *Ветеринарна медицина*. 2013. № 97. С. 186–188.

314. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. Москва : Высшая шк., 1986. 446 с.

315. Егоров Н. С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. Москва : Высшая шк., 1965. 212 с.

316. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. для студ. биол. спец. ун-тов. Москва : Высшая шк. 448 с.

317. Егорова А., Макаринская А., Цюндык С. Технологические основы производства жидких премиксов. *Наукові праці ОНАХТ/ МОіНУ*. 2002. Вип. 24: Нове в технології зберігання та перероб. зерна. С. 171–175.

318. Живаева К. А. Особенности пищеварения кроликов. *Молодежь и наука*. 2017. № 4. С. 34.

319. Заріцький А. М., Глушкевич Т. Г., Бубало В. О. Актуальність сальмонели в Україні та перспективи боротьби з нею. *Інфекційні хвороби*. 2016. № 3. С. 5–9.

320. Иванова Е. И., Попкова С. М., Шабанова Н. М. Адгезивные свойства микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы организма человека. *Биол. Экол*. 2011. № 4. С. 25–29.

321. Измайлова Н. А. Повышение резистентности кроликов при введении в рацион пробиотиков. *Матеріали IVIII Міжнародної науково-практичної конференції «Наука та інновації»*, м. Київ. 2018. С. 40–43.

322. Изучение и оценка биологических свойств пробиотических штаммов рода *Lactobacillus*, перспективных для производства биологически активных добавок к пище / Г. С. Волкова та ін. *Вопросы питания.* 2018. № 87. С. 54–55.

323. Интизаров М. М. Микрофлора тела животных: Лекция. Москва : МВА им К.И. Скрябина, 1994. 20 с.

324. Ібатуллін І. І., Панасенко Ю. О., Кононенко В. К. . Особливості шлунково-кишкового тракту та годівлі кролів. *Ефективне тваринництво*. 2006. № 8. С. 22–24.

325. Калачнюк Г. Пробіотики у тваринництві. *Тваринництво України*. 1996. № 5. С. 16–18.

326. Калдыркаева З. С. Антагонизм бактерий *Lactobacillus acidophilus* к бактериям Klebsiella pneumonia. *Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы XI-й Международной студенческой научной конференции*, м. Ульяновск. 2018. С. 40–42.

327. Калугин Ю. А., Михайлова Р. И. Выделение и состав кала у кроликов. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана*. 2015. № 2. С. 123–128.

328. Калугин Ю. А. Пищеварение у кроликов. *Кролиководство и звероводство*. 2009. № 5. С. 24–28.

329. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. Москва : Наука, 1975. 392 с.

330. Кигель Н. Ф. Новый бактериальный препарат «АФ» на основе молочнокислих бактерий и его биологические свойства. *Мікробіологічний журнал*. 2000. № 3. С. 49–55.

331. Кизнер И. Л. Кролиководство вполне рентабельно. *Кролиководство и звероводство*. 2008. № 3. С. 32.

332. Кириченко В. А., Кот С. П. Мікробіологія молока і молочних продуктів: курс лекцій для здобувачів вищої освіти ступеня "магістр" спеціальності 204 - "ТВППТ". Миколаїв : МНАУ, 2019. 181 с.

333. Кігель Н. Ф., Насиров Г. Ф. Критерії відбору заквашувальних культур. *Вісник аграрної науки*. 2002. № 2. С. 58–60.

334. Коваленко Н. К. Биология молочнокислых бактерий пищеварительного тракта человека и животных : автореф. дис. … д-ра біол. наук : 03.00.07. Київ, 1991. 29 с.

335. Коваленко Н. К. Биотехнология культивирования молочнокислых бактерий. *Молочная промышленность*. 2002. № 2. С. 24–25.

336. Ковальчук І. І., Ящук І. В. Сучасний стан та перспективи розвитку галузі кролівництва в Україні. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва*. 2016. № 5. С. 24–29.

337. Колеснікова О. В. Взаємозв’язок функціональної активності кишківника з його мікрофлорою в пацієнтів із метаболічно-асоційованими захворюваннями. *The Practitioner*. 2019. № 1. С. 41–49.

338. Королева О. Е. Влияние холодового стресса на изменение микрофлоры желудочно-кишечного тракта у мышей различных линий. *Вопр. физико-хим. биол. в ветеринарии: Сб. науч. тр.* 2006. С. 82–85.

339. Коцюбенко Г. А. Відтворні та продуктивні якості кролів за різних технологій вирощування. *Вісник аграрної науки*. 2012. Т. 706, № 2. С. 35–37.

340. Коцюмбас І. Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. Львів : Тріадаплюс, 2006. 360 с.

341. Кочурко Л. И., Лиходед В. Г., Лобова Е. А. Показатели иммунитета к эндотоксину грамотрицательных бактерий при кишечных дисбактериозах. *ЖМЭИ*. 1998. № 5. С. 25–27.

342. Курляк П. Повноцінне меню для кролів. *Аграрна Країна сайт для успішних селян та фермерів*. URL: http://agrokraina.com.ua/animals/223-povnocnne-menyu-dlya-krolv.html (дата звернення: 18.10.2022).

343. Лазовская А. Л. Обоснование применения антибиотиков молодняку сельскохозяйственных животных против актиномицетных инфекций. *Аграр. наука Евро-Северо-Востока*. 2010. № 2. С. 52–55.

344. Лактионов К. С. Симбионтное пищеварение у кроликов и пути увеличения использования углеводов кормов : автореф. дис. … д-ра біол. наук : 03.00.13. Белгород, 2009. 44 с.

345. Лиходед В. Г., Бондаренко В. М. Антиэндотоксиновый иммунитет в регуляции численности эшерихиозной микрофлоры кишечника. Москва : Медицина, 2007. 216 с.

346. Ліманська Н. В., Мерліч А. Г., Іваниця В. О. Поширення *Lactobacillus plantarum* у ферментованому рослинному матеріалі з України і Франції. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2016. С. 169–174.

347. Літвієнко В. М., Єременко М., Науменко А. Раціональне застосування пробіотичних кормових добавок у тваринництві. *Український часопис ветеринарних наук*. 2017. № 273. С. 109–114.

348. Лучин І., Дармограй Л. Інтенсивне виробництво кролятини – шлях до розв’язання білкової проблеми. *Тваринництво України*. 2015. № 7. С. 20–22.

349. Лях В. Р., Червецова В. Г., Кричковська А. М. Пробіотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту. *Chemistry, Technology and Application of Substance*. 2018. № 1. С. 72–77.

350. Малик Н. И., Панин А. Н., Вершинина И. Ю. Пробиотики: теоретические и практические аспекты. *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. 2006. № 5. С. 58–62.

351. Марьин В. А., Харитонов Д. В. Исследование схем последовательности фаз роста периодической культуры бифидобактерий или лактобактерий. *Техника и технология пищевых производств*. 2010. № 4. С. 24–28.

352. Методичні рекомендації з конструювання пробіотиків та застосування їх у практиці ветеринарної медицини / В. Г. Скибіцький та ін. Київ : ЗАТ «Нічлава», 2013. 39 с.

353. Методы общей бактериологии : В 3-х т. Москва : Мир, 1984. Т. 3. 264 с.

354. Мефед К. М. Новый споровый пробиотик Ирилис и его использование в ветеринарной практике : автореф. дис. … канд. біол. наук : 03.00.07. Москва, 2007. 22 с.

355. Микробиологическая диагностика дисбактериозов: Методические рекомендации / В. Знаменский та ін. 1986. 27 с.

356. Митрофанова В. А., Матвеева М. В. Продуктивные качества кроликов и краткая характеристика их пищеварения. *Наука и общество в условиях глобализации*. 2017. № 1. С. 23–24.

357. Мухамедов И. М., Намазов Д. Ю. Изучение особенностей пестицидного дисбактериоза в эксперименте. *Актуальные проблемы желудочно-кишечной, сердечно-сосудистой и урологической патологии. Ташкент.* 1983. С. 77–79.

358. Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів : Наказ МОЗ України від 14.12.2009 р. № 944. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0053-10#Text (дата звернення: 18.10.2022).

359. Наконечний І., Кіщак І., Карпенко А. Залежність циркуляції сальмонел на півдні України від екологічних факторів. *Ветеринарна медицина України*. 1996. № 9. С. 19–20.

360. Огірчук К. С., Коваленко Н. К. Антагоністичні властивості пробіотичного штаму *Lactobacillus gasseri* 55 збагаченого селеном. *ScienceRise*. 2016. № 18. С. 6–10.

361. Огляд інноваційних біотехнологій заквашувальних культур та бактеріальних препаратів Інституту продовольчих ресурсів НААН / Н. Ф. Кігель та ін. *Продовольчі ресурси*. 2017. № 9. С. 195–202.

362. Определение экономической эффективности в земледелии и животноводстве разработок по сельскохозяйственной микробиологии: методические рекомендации. Чернигов : Укр. НИИСХМ УААН, 1991. 98 с.

363. Основные тенденции в разработке современных химических и биологических средств защиты сельскохозяйственных животных / О. В. Кустикова та ін. *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. 2018. № 23. С. 849–851.

364. Особливості кишкового мікробоценозу молодняку кролів за різних типів годівлі / Ю. М. Похилько та ін. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2015. № 22. С. 48–52.

365. Оцінка безпечності кормових добавок. Загальні підходи (Методичні рекомендації) / І. Я. Коцюмбас та ін. Львів : ДНДКІ вет. препаратів та корм. добавок, 2011. 21 с.

366. Пауликас В. Ю. Паразитоценоз желудочно-кишечного тракта свиней. Москва : Агропромиздат, 1990. 82 с.

367. Про затвердження форм заяв, текстової інформації на пакуванні (маркування), переліку матеріалів реєстраційного досьє та порядку його формування. *Офіційний вебпортал парламенту України*. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0727-08#Text (дата звернення: 18.10.2022).

368. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Виділення із травної системи кролів молочнокислих бактерій, перспективних для створення пробіотичних препаратів. *Біоресурси і природокористування*. 2016. С. 63–66.

369. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Відновлення та корекція балансу мікробіоти шлунково-кишкового тракту кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків введення антибіотиків. *Біоресурси і природокористування*. 2018. № 10. С. 19–31.

370. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Вплив середовища культивування на антагоністичну активність молочнокислих бактерій. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2016. № 24. С. 64–72.

371. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Пробіотичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів. *Біологічні Студії*. 2018. Т. 1, № 12. С. 35–46.

372. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Склад мікробоценозу шлунково-кишкового тракту молодняку кролів залежно від раціону. *Науково- технічний бюлетень*. 2016. Т. 1, № 17. С. 141–146.

373. Поширення сальмонельозу тварин та птиці в Україні у 2015–2018 роках / І. В. Галка та ін. *Ветеринарна біотехнологія*. 2019. № 35. С. 22–29.

374. Проваторов Г. В., Ладика В. І., Бондарчук Л. В. Нормигодівлі, раціони і поживність кормів для різних сільськогосподарських тварин: довідник / ред. В. О. Проваторова. Суми : Університетськакнига, 2009. 489 с.

375. Пучнин А. М., Фомин А. А., Шулаев Г. М. Использование пробиотического препарата «Бацелл» на продуктивность молодняка кроликов. *Вестн. Тамб. ун-та.* 2011. № 2. С. 678–680.

376. Раскошная Т., Семенихина В. Питательные среды для культивирования ацидофильной молочнокислой палочки. *Молочная промышленность*. 2010. № 11. С. 39–41.

377. Реєстр ветеринарних препаратів , кормових добавок, преміксів та готових кормів - Набори даних - Портал відкритих даних. *Головна сторінка - Data.gov.ua*. URL: https://data.gov.ua/dataset/8f3e00b2-16e8-4b30-af7d-b9212837b0a6 (дата звернення: 18.10.2022).

378. Решетніченко О., Орлов Л., Крюков В. Пробіотики в годівлі тварин. *Тваринництво України*. 2012. № 5. С. 25–29.

379. Рєзніков О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах. *Вісник НАН України*. 2001. № 11. С. 30–33.

380. Романов В.Е., Ивонин А.Г., Бондаренко А.Л. Метод определения бактерисвязывающей активности эритроцитов : пат. RU 2360969 Росія : RU 2360969. 2009 Jul 10. Int CL C12Q1/02.

381. Ростовые и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой сред / М. Б. Цинберг та ін. *Антибиотики и химиотерапия*. 2003. Т. 48, № 12. С. 9–13.

382. Рябцева Е. В., Понамарёв Н. М., Барышников П. И. Динамика микрофлоры кишечника кроликов после дегельминтизации альбеном. *Аграрная наука – сельскому хозяйству*. 2007. С. 428–430.

383. Салманов А. Г. Стратегічний план дій України з профілактики інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги та антимікробної резистентності. Київ : Аграр Медіа Груп, 2016. 380 с.

384. Сверчкова Н., Коломиец Э. Пробиотические препараты для ветеринарии и кормопроизводства. *Беларусь: Наука и инновации*. 2016. Т. 5, № 159. С. 38–39.

385. Сидоренко С. В., Тишков В. И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биологической химии*. 2004. № 44. С. 263–306.

386. Сливка І. М., Цісарик О. Й. Біотехнологія створення вітчизняних бактеріальних препаратів для молочної промисловості України. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького. Серія: Харчові технології*. 2016. № 18. С. 103–110.

387. Снегов А. Самый полный справочник кролиководa. Москва : АСТ, 2011. 320 с.

388. Соломон А. М., Бондар М. М. Заквашувальні культури у молочній промисловості. *Аграрна наука та харчові технології*. 2019. № 5. С. 128–135.

389. Сорокин В. В., Тимошко М. А., Николаева А. В. Нормальная микрофлора кишечника животных. Кишинёв : Штиинца, 1973. 80 с.

390. Справочник кролиководa / ред. П. С. Заболотского. Ростов : Феникс, 2004. 256 с.

391. Стегній Б., Гужвинська С. Пробіотики у тваринництві. *Вісник аграрної науки*. 2005. № 2. С. 26–29.

392. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків / С. В. Калініченко та ін. *Ukrainian biopharmaceutical journal*. 2016. № 1. С. 4–10.

393. Технологія виробництва продукції кролівництва та звірівництва : навчальний посібник / Г. А. Коцюбенко та ін. Миколаїв : МДАУ, 2011. 431 с.

394. Технологія пробіотиків / С. О. Старовойтова та ін. Київ : НУХТ, 2012. 318 с.

395. Тимошко М. А. Микрофлора желудочно-кишечного тракта телят и поросят при стрессе / Стресс и адаптация сельскохозяйственных животных в условиях индустриальных технологий. Кишинев : Штиинца, 1992. 188 с.

396. Тимченко Л. Д., Пенькова Н. И., Катутина Л. С. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капустная среда для культивирования лактобактерий. *Вестник МГОУ. Сер. Естественные науки*. 2010. № 2. С. 152.

397. Тищенко Л. М., Шпак Ю. Ю. Кролятина як прогресивний напрямок у м’ясопереробній галузі. *Научные труды SWorld*. 2016. № 2. С. 41–43.

398. Третьяков А. М. Влияние препарата Аверсект на микробный статус желудочно-кишечного тракта кроликов. *Материалы науч.-практ. конф. преподавателей, сотрудников, аспирантов БГСХА*, 4 лют. 2002 р. – 7 лют. 2022 р. 2002. С. 79–81.

399. Третьяков А. М., Евдокимов П. И. Постдегельминтизационные дисбактериозы у овец. *Ветеринария*. 2008. № 3. С. 14–17.

400. Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения. *Фундаментальные исследования*. 2012. № 1. С. 184–193.

401. Физиологическое значение кишечной микрофлоры / С. Ю. Кучумова та ін. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2011. № 22. С. 17–27.

402. Цыремпилова Н., Цыдыпов В. Количественный и видовой состав микроорганизмов в кишечнике телят под влиянием препарата «Аверсект-2». *Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова*. 2009. С. 105–110.

403. Чичкин А. Пищеварительный тракт в бактериологическом отношении: Общий очерк флоры. Москва : Печат. С. П. Яковл., 1907. 307 с.

404. Шахмарданов М. З. До питання про антибактеріальну терапію шлунково-кишкової форми сальмонельозу. *Епідеміологія та інфекційні хвороби*. 2013. № 1. С. 4–7.

405. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Экология и функциональное питание. Москва : Грант, 1998. 288 с.

406. Шендеров Б. А. Пробиотики и функциональное питание. Москва : Грант, 2001. 288 с.

407. Эйсфельд Д. А. Биологическая характеристика производственных штаммов лактобактерий : автореф. дис. … канд. біол. наук : 03.00.07. Пермь, 2002. 24 с.

408. Эффективное кролиководство: учебное пособие / В. И. Комлацкий та ін. Ростов-на-Дону : Общество с ограниченной ответственностью "Феникс". 2013. 224 с.

409. Ямборко Г., Соловйова І. Ефективність різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2007. № 1. С. 53–59.

410. Янковський Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. Київ : Эксперт ЛТД, 2005. 362 с.

411. Яшин А. В. Классификация дисбактериозов кишечника. *Ветеринарный консультант*. 2006. № 20. С. 9.

Додаток А

Морфологія клітин та кислотоутворююча здатність ізолятів молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів

№ З/П	Назва ізоляту	Мікроскопія	Титруєма кислотність, °Т
1	L-1/1	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	80±5,0
2	L-1/2	довгі* грампозитивні попарні палички	110±5,0
3	L-1/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	120±7,0
4	L-1/4	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	94,0±9,0
5	L-1/5	короткі** поодинокі грампозитивні палички	110±3,0
6	L-2/1	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	125±5,0
7	L-2/2	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	94,0±9,0
8	L-2/3	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	141±8,0
9	L-2/4	короткі** поодинокі грампозитивні палички	80±5,0
10	L-2/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	139±13,0
11	L-3/1	короткі** поодинокі грампозитивні палички	85±2,0
12	L-3/2	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	110±10,0
13	L-3/3	грампозитивні поодинокі палички	156±4,0
14	L-3/4	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	90±15,0
15	L-3/5	грампозитивні поодинокі палички	90±6,0
16	L-4/1	тонкі короткі** палички в ланцюжках	240±2,5
17	L-4/2	грампозитивні поодинокі палички	120±4,0
18	L-4/3	короткі** поодинокі грампозитивні палички	130±2,0
19	L-4/4	грампозитивні поодинокі палички	120±3,0
20	L-4/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	110±10,0
21	L-5/1	довгі* грампозитивні попарні палички	90±1,0
22	L-5/2	короткі** поодинокі грампозитивні палички	160±6,0
23	L-5/3	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	152±4,0
24	L-5/4	тонкі короткі** палички або закручені в легку спіраль	280±2,5
25	L-5/5	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	93±2,0
26	L-6/1	довгі* грампозитивні попарні палички	82±4,5
27	L-6/2	грампозитивні поодинокі палички	143±1,0
28	L-6/3	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	90±2,0
29	L-6/4	грампозитивні поодинокі палички	120±21,0
30	L-6/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	93±7,0

Продовження додатку А

31	L-7/1	короткі** гампозитивні палички розташовані попарно	133±9,0
32	L-7/2	палички розташовані попарно	110±7,0
33	L-7/3	грампозитивні поодинокі палички	102±3,0
34	L-7/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	132±12,0
35	L-7/5	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	144±6,0
36	L-8/1	грампозитивні поодинокі палички	95±8,0
37	L-8/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	98±13,0
38	L-8/3	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±3,0
39	L-8/4	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	132±12,0
40	L-8/5	палички розташовані попарно	92±3,0
41	L-9/1	грампозитивні палички зібранів короткі ланцюжки	94±9,0
42	L-9/2	грампозитивні поодинокі палички	108±14,0
43	L-9/3	грампозитивні поодинокі палички	94±3,0
44	L-9/4	грампозитивні палички зібрані в короткі ланцюжки	144±6,0
45	L-9/5	довгі* грампозитивні поодинокі палички	83±2,5
46	L-10/1	грампозитивні палички зібранів короткі ланцюжки	105±12,0
47	L-10/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	148±18,0
48	L-10/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	97±4,0
49	L-10/4	грампозитивні поодинокі палички	102±3,0
50	L-10/5	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	107±14,0
51	L-11/1	палички розташовані попарно	75±15,0
52	L-11/2	грампозитивні поодинокі палички	115±18,0
53	L-11/3	короткі** гампозитивні палички розташовані попарно	107±14,0
54	L-11/4	грампозитивні палички зібранів короткі ланцюжки	102±3,0
55	L-11/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	132±12,0
56	L-12/1	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
57	L-12/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	137±18,0
58	L-12/3	грампозитивні поодинокі палички	92±3,0
59	L-12/4	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	132±12,0
60	L-12/5	грампозитивні поодинокі палички	144±6,0
61	L-13/1	грампозитивні поодинокі палички	103±11,0
62	L-13/2	тонкі, дуже довгі* палички	290±3,0
63	L-13/3	короткі** палички розташовані попарно	95±3,0
64	L-13/4	палички розташовані попарно	132±12,0
65	L-13/5	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	92±3,0

Продовження додатку А

66	L-14/1	грампозитивні палички зібранів короткі ланцюжки	102±3,0
67	L-14/2	грампозитивні палички зібрані в короткі ланцюжки	107±14,0
68	L-14/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	98±13,0
69	L-14/4	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	115±18,0
70	L-14/5	грампозитивні палички зібрані в короткі ланцюжки	132±12,0
71	L-15/1	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	92±3,0
72	L-15/2	короткі** гампозитивні палички розташовані попарно	102±3,0
73	L-15/3	грампозитивні поодинокі палички	105±2,0
74	L-15/4	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	127±18,0
75	L-15/5	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
76	L-16/1	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	220±2,0
77	L-16/2	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	132±12,0
78	L-16/3	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	250±2,0
79	L-16/4	грампозитивні поодинокі палички	144±6,0
80	L-16/5	короткі** гампозитивні палички розташовані попарно	102±3,0
81	L-17/1	грампозитивні поодинокі палички	107±14,0
82	L-17/2	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	180±5,0
83	L-17/3	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	210±10,0
84	L-17/4	короткі** палички розташовані попарно	102±4,0
85	L-17/5	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	100±5,0
86	L-18/1	короткі** гампозитивні палички розташовані попарно	95±3,0
87	L-18/2	довгі* грампозитивні поодинокі палички	117±15,0
88	L-18/3	грампозитивні поодинокі палички	98±7,5
89	L-18/4	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	132±12,0
90	L-18/5	грампозитивні поодинокі палички	96±2,0
91	L-19/1	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	108±14,0
92	L-19/2	грампозитивні поодинокі палички	85±7,5
93	L-19/3	короткі** гампозитивні палички розташовані попарно	98±13,0

Продовження додатку А

94	L-19/4	грампозитивні поодинокі палички	124±10,0
95	L-19/5	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	92±3,0
96	L-20/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	115±18,0
97	L-20/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	105±12,0
98	L-20/3	короткі** гампозитивні палички розташовані попарно	144±6,0
99	L-20/4	грампозитивні поодинокі палички	95±14,0
100	L-20/5	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	127±18,0
101	L-21/1	грампозитивні поодинокі палички	100±5,0
102	L-21/2	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	115±8,0
103	L-21/3	грампозитивні поодинокі палички	105±12,0
104	L-21/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	95±8,0
105	L-21/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±4,0
106	L-22/1	грампозитивні поодинокі палички	108±14,0
107	L-22/2	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	98±13,0
108	L-22/3	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	88±2,0
109	L-22/4	грампозитивні поодинокі палички	100±5,0
110	L-22/5	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	102±4,0
111	L-23/1	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	92±3,0
112	L-23/2	грампозитивні поодинокі палички	100±5,0
113	L-23/3	грампозитивні поодинокі палички	144±6,0
114	L-23/4	грампозитивні палички зібрані в короткі ланцюжки	132±12,0
115	L-23/5	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	92±3,0
116	L-24/1	грампозитивні поодинокі палички	88±2,0
117	L-24/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	94±12,0
118	L-24/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±4,0
119	L-24/4	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	98±13,0
120	L-24/5	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	114±8,0
121	L-25/1	грампозитивні поодинокі палички	132±14,0
122	L-25/2	грампозитивні поодинокі палички	100±5,0
123	L-25/3	грампозитивні поодинокі палички	108±14,0
124	L-25/4	короткі** палички розташовані попарно	144±6,0
125	L-25/5	короткі** палички розташовані попарно	94,0±9,0
126	L-26/1	грампозитивні поодинокі палички	107±14,0
127	L-26/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	88±2,0
128	L-26/3	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	95±8,0

Продовження додатку А

129	L-26/4	грампозитивні палички зібрані в короткі ланцюжки	108±14,0
130	L-26/5	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±4,0
131	L-27/1	короткі** поодинокі грампозитивні палички	88±2,0
132	L-27/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	100±5,0
133	L-27/3	короткі** поодинокі грампозитивні палички	94,0±9,0
134	L-27/4	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	92±3,0
135	L-27/5	короткі** грампозитивні поодинокі палички	132±12,0
136	L-28/1	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
137	L-28/2	грампозитивні поодинокі палички	94,0±9,0
138	L-28/3	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	88±2,0
139	L-28/4	грампозитивні поодинокі палички	114±8,0
140	L-28/5	короткі** поодинокі грампозитивні палички	94,0±9,0
141	L-29/1	грампозитивні поодинокі палички	102±4,0
142	L-29/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	92±3,0
143	L-29/3	довгі* грампозитивні попарні палички	114±8,0
144	L-29/4	короткі** поодинокі грампозитивні палички	98±13,0
145	L-29/5	короткі** палички розташовані попарно	88±2,0
146	L-30/1	довгі* грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	102±4,0
147	L-30/2	короткі** палички розташовані попарно	100±5,0
148	L-30/3	довгі* грампозитивні попарні палички	108±14,0
149	L-30/4	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	94±12,0
150	L-30/5	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	128±16,0
151	L-31/1	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	107±14,0
152	L-31/2	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках	250±5,0
153	L-31/3	короткі** грампозитивні палички у вигляді коротких ланцюжків	144±6,0
154	L-31/4	короткі** палички розташовані попарно	100±5,0
155	L-31/5	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	95±8,0
156	L-32/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	132±12,0
157	L-32/2	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	98±13,0
158	L-32/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	88±2,0
159	L-32/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
160	L-32/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	114±8,0
161	L-33/1	короткі** грампозитивні поодинокі палички	108±14,0
162	L-33/2	короткі** грампозитивні поодинокі палички	115±18,0
163	L-33/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±4,0
164	L-33/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	100±5,0

Продовження додатку А

165	L-33/5	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	94±12,0
166	L-34/1	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	93±3,0
167	L-34/2	короткі** грампозитивні поодинокі палички	132±12,0
168	L-34/3	грампозитивні палички зібранів ланцюжки	125±24,0
169	L-34/4	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	102±4,0
170	L-34/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	84±2,0
171	L-35/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
172	L-35/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	132±12,0
173	L-35/3	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	144±6,0
174	L-35/4	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	92±3,0
175	L-35/5	грампозитивні палички зібранів ланцюжки	100±5,0
176	L-36/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	88±2,0
177	L-36/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	96±3,0
178	L-36/3	короткі** грампозитивні поодинокі палички	132±12,0
179	L-36/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	95±8,0
180	L-36/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
181	L-37/1	грампозитивні палички зібранів ланцюжки	102±4,0
182	L-37/2	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	108±14,0
183	L-37/3	короткі** грампозитивні поодинокі палички	114±8,0
184	L-37/4	довгі* грампозитивні поодинокі палички	112±13,0
185	L-37/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	122±6,0
186	L-38/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	105±2,5
187	L-38/2	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	94±12,0
188	L-38/3	короткі** грампозитивні поодинокі палички	84±2,0
189	L-38/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	95±8,0
190	L-38/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	92±3,0
191	L-39/1	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	108±14,0
192	L-39/2	довгі* грампозитивні поодинокі палички	200±2,5
193	L-39/3	короткі** грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	144±6,0
194	L-39/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±4,0
195	L-39/5	короткі** грампозитивні поодинокі палички	107±14,0
196	L-40/1	короткі** грампозитивні поодинокі палички	136±12,0
197	L-40/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	100±5,0
198	L-40/3	короткі** поодинокі грампозитивні палички	88±2,0
199	L-40/4	грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	144±6,0
200	L-40/5	короткі** поодинокі грампозитивні палички	115±4,0
201	L-41/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	98±13,0
202	L-41/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	132±12,0

Продовження додатку А

203	L-41/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
204	L-41/4	короткі** поодинокі грампозитивні палички	115±18,0
205	L-41/5	короткі** поодинокі грампозитивні палички	95±8,0
206	L-42/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
207	L-42/2	короткі** грампозитивні поодинокі палички	87±2,0
208	L-42/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	114±8,0
209	L-42/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	135±7,5
210	L-42/5	грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	92±3,0
211	L-43/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	94±12,0
212	L-43/2	короткі** грампозитивні поодинокі палички	144±6,0
213	L-43/3	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	107±14,0
214	L-43/4	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	102±4,0
215	L-43/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	112±13,0
216	L-44/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	125±12,5
217	L-44/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	100±5,0
218	L-44/3	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	108±14,0
219	L-44/4	короткі** грампозитивні поодинокі палички	132±12,0
220	L-44/5	грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	88±2,0
221	L-45/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	94±12,0
222	L-45/2	короткі** грампозитивні поодинокі палички	104±16,0
223	L-45/3	грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	106±4,0
224	L-45/4	грампозитивні палички зібранів ланцюжки	95±8,0
225	L-45/5	грампозитивні палички зібранів ланцюжки	105±2,5
226	L-46/1	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	115±18,0
227	L-46/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±14,0
228	L-46/3	грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	108±14,0
229	L-46/4	короткі** грампозитивні поодинокі палички	112±13,0
230	L-46/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	94±16,0
231	L-47/1	короткі** грампозитивні поодинокі палички	100±5,0
232	L-47/2	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	142±16,0
233	L-47/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	144±6,0
234	L-47/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	108±17,0
235	L-47/5	короткі** грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	84±2,0
236	L-48/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	114±8,0
237	L-48/2	грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	85±3,0
238	L-48/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±4,0
239	L-48/4	короткі** грампозитивні поодинокі палички	93±2,0
240	L-48/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	143±4,0

Продовження додатку А

241	L-49/1	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках	130±10,0
242	L-49/2	грампозитивні палички зібрані попарно або в короткі ланцюжки	88±2,5
243	L-49/3	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	102±4,0
244	L-49/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	81±2,0
245	L-49/5	короткі** грампозитивні поодинокі палички	108±14,0
246	L-50/1	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	112±12,0
247	L-50/2	короткі** грампозитивні поодинокі палички	76±4,0
248	L-50/3	короткі** грампозитивні поодинокі палички	114±8,0
249	L-50/4	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	84±2,0
250	L-50/5	грампозитивні палички зібрані в ланцюжки	144±6,0

Додаток Б

Мікроскопія молочнокислих бактерій при сувмісному культивуванні

Назва ізолятів	Мікроскопія
L-4/1+L-5/4	короткі** палички в ланцюжках або закручені в легку спіраль
L-13/2+L-4/1	короткі** палички в ланцюжках та тонкі довгі* палички
L-16/1+L-4/1	короткі** палички, поодинокі або парами та в коротких ланцюжках
L-16/3+L-4/1	короткі** палички, поодинокі або парами та в коротких ланцюжках
L-17/2+L-4/1	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами та в коротких ланцюжках
L-17/3+L-4/1	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами та в ланцюжках
L-31/2+L-4/1	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та тонкі короткі** палички в ланцюжках
L-39/2+L-4/1	довгі* поодинокі палички та тонкі короткі** палички в ланцюжках
L-49/1+L-4/1	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та тонкі короткі** палички в ланцюжках
L-5/4+L-13/2	тонкі короткі** палички або закручені в легку спіраль та довгі* палички
L-16/1+L-5/4	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках або закручені в легку спіраль
L-16/3+L-5/4	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках або закручені в легку спіраль
L-17/2+L-5/4	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках або закручені в легку спіраль
L-17/3+L-5/4	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках або закручені в легку спіраль
L-31/2+L-5/4	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички або закручені в легку спіраль
L-39/2+L-5/4	довгі* поодинокі палички та короткі** палички або закручені в легку спіраль
L-49/1+L-5/4	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички або закручені в легку спіраль
L-16/1+L-13/2	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках та довгі* поодинокі палички
L-16/3+L-13/2	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках та довгі* поодинокі палички
L-17/2+L-13/2	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках та довгі* роодинокі палички
L-17/3+L-13/2	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках та довгі* роодинокі палички
L-31/2+L-13/2	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках тонкі, дуже довгі* палички
L-39/2+L-13/2	довгі* поодинокі палички
L-16/3+L-16/1	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-17/2+L-16/1	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-17/3+L-16/1	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-31/2+L-16/1	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-39/2+L-16/1	довгі* поодинокі палички та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках

Продовження додатку Б

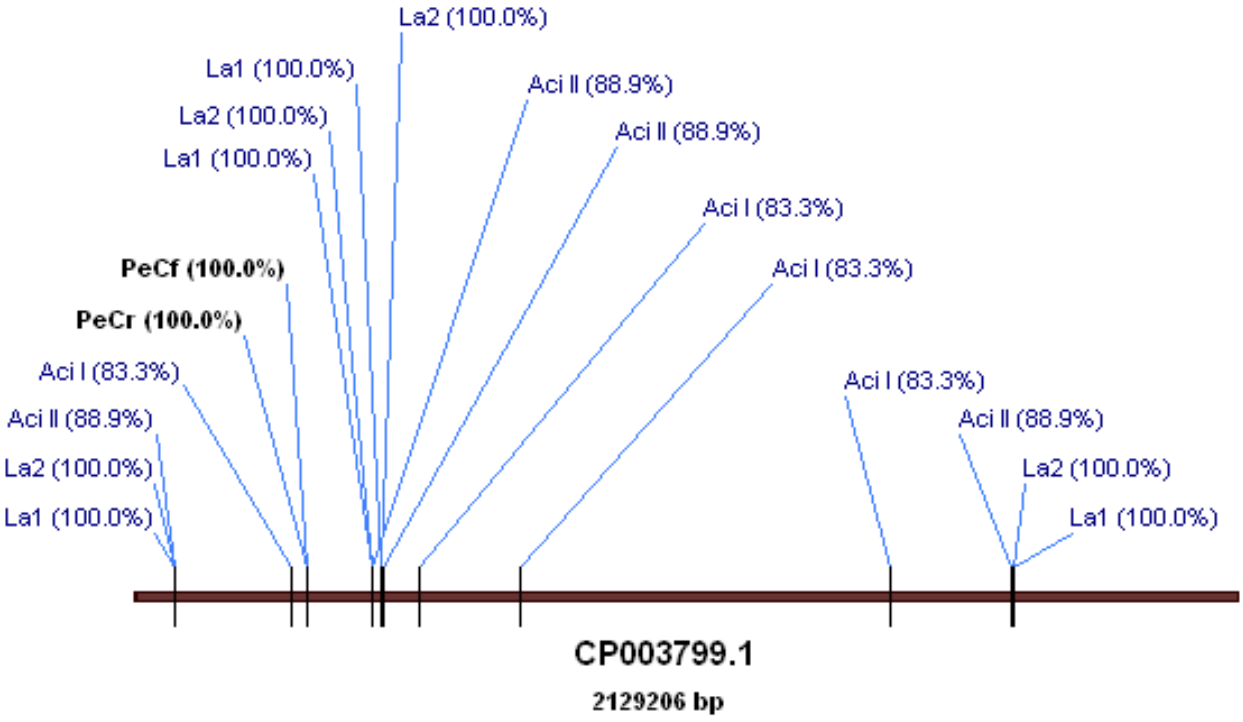
L-49/1+L-16/1	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-17/2+L-16/3	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-17/3+L-16/3	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-31/2+L-16/3	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-39/2+L-16/3	довгі* поодинокі палички та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-49/1+L-16/3	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-17/3+L-17/2	короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-31/2+L-17/2	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-39/2+L-17/2	довгі* поодинокі палички та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-49/1+L-17/2	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-31/2+L-17/3	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-39/2+L-17/3	довгі* поодинокі палички та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-49/1+L-17/3	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках та короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках
L-39/2+L-31/2	довгі* поодинокі палички та зернисті довгі* палички в ланцюжках
L-49/1+L-31/2	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках

Примітка*:* *довжина клітини більше 7 мкм; **довжина клітини менше 5 мкм;+ - позитивний результат; - - негативний результат.

Додаток В

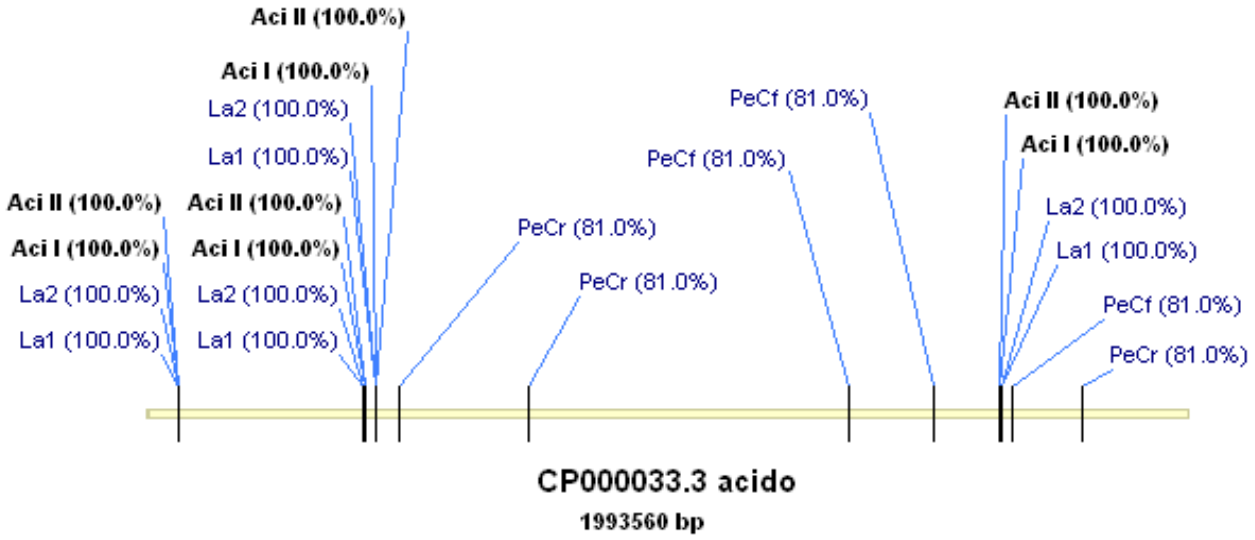
Специфічність праймерів до послідовності геномної ДНК бактерій роду *Lactobacillus* показана за допомогою програмного забезпечення “Vector NTI” v.10.0.1 (Invitrogen)

DNA 'CP003799.1'
Lactobacillus helveticus R0052, complete genome



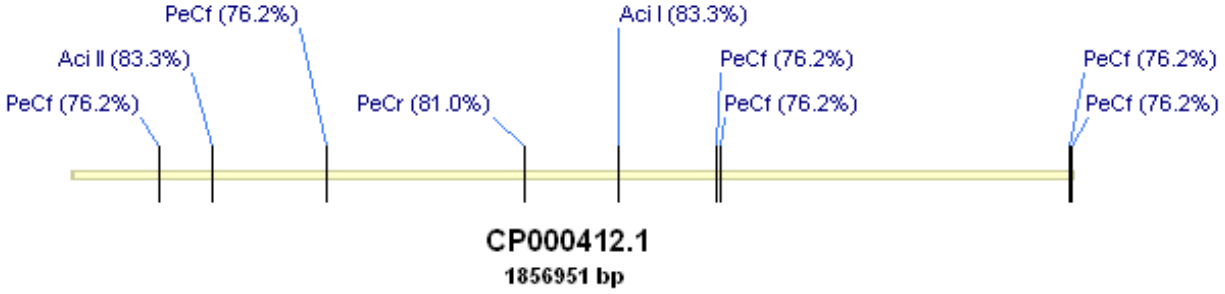
DNA 'CP000033.3_acido'
Lactobacillus acidophilus NCFM, complete genome

Продовження додатку В



DNA 'CP000412.1'

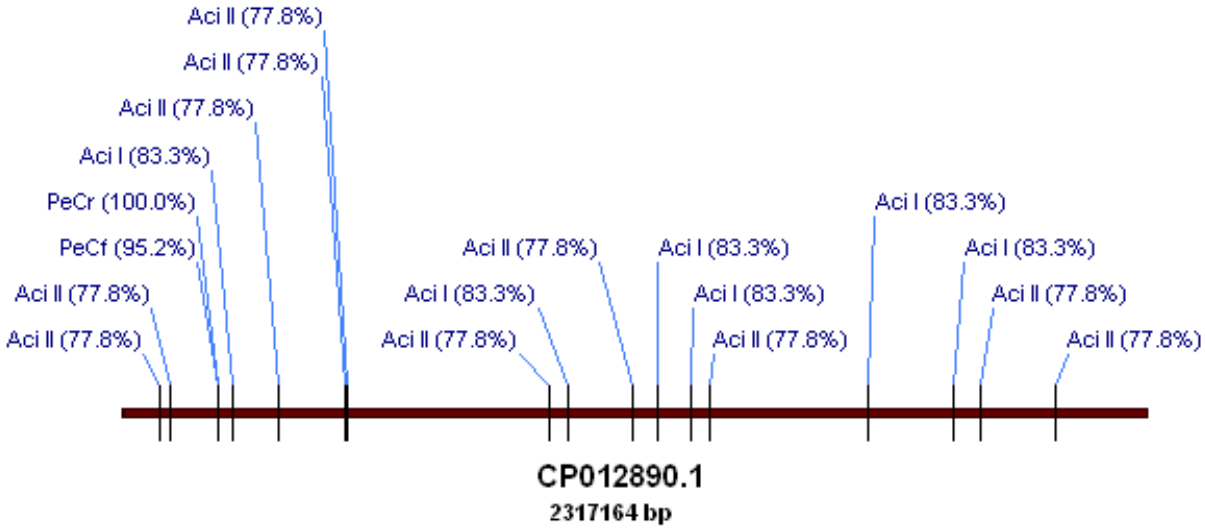
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BAA-365, complete genome



DNA 'CP012890.1'

Lactobacillus gallinarum strain HFD4, complete genome

Продовження додатку В



Додаток Г

ЗАТВЕРДЖУЮ:
Директор Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН

_____ А.М. Москаленко

"6" квітня 2020 р.

ВИСНОВОК

щодо патогенних властивостей штаму *Lactobacillus* sp. 13/2 за результатами дослідження вірулентності для безпородних білих мишей.

Штам *Lactobacillus* sp. 13/2 для випробування надано лабораторією пробіотиків ІСМАВ НААН.

Досліджуваний рід і вид мікроорганізмів не включено до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [1–3, 5]. Щоб підтвердити відсутність патогенної дії даного штаму для теплокровних лабораторних тварин, досліджували один із показників патогенності – вірулентність активних життєздатних клітин бактерій. Для досліджень брали максимальні дози матеріалу (таблиця).

Перевірку патогенних властивостей штаму виконано з використанням безпородних білих мишей вагою 18–20 г шляхом введення суспензій клітин бактерій перорально через зонд та внутрішньочеревно шляхом ін'єкцій. Миші були адаптовані до умов утримання. Догляд за тваринами після ін'єкцій досліджуваного матеріалу проводили щоденно упродовж 15 діб.

Визначали вірулентність суспензії активних клітин, отриманих при культивуванні штаму упродовж 72 годин в рідкому поживному середовищі MRS за температури 37 ± 0,5°С. Суспензію клітин бактерій *Lactobacillus* sp. 13/2 готували на стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту каламутності та шляхом титрування з висівом на живильне агаризоване середовище(капустяний агар).

Визначали інфективність (інвазивність) штаму за ймовірної дисемінації бактерій у тканини внутрішніх органів тварин з урахуванням можливих природніх шляхів проникнення(per os). З цією метою мишам вводили одноразово активну культуру бактерій в максимальних дозах, які не призводять до загибелі тварин. Через 15 діб після зараження проводили вимушений забій лабораторних білих мишей, мікроскопічні дослідження фарбованих мазків-відбитків їх внутрішніх органів та висіви зразків тканин на живильне середовище.

За період спостереження після введення суспензії живих клітин бактерій (перорально у дозах від $0,5 \times 10^9$ до 5×10^9 колонієутворюючих одиниць (КУО) у 0,5 $см^3$ стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію

Продовження додатку Г

на мишу та внутрішньочеревно у дозах від 1×10^9 до 5×10^9 КУО/0,5 $см^3$) тварини добре поїдали корм, мали жвавий вигляд, не було відмічено змін хутряного покриву. Достовірна різниця в масі та температурі тіла дослідних і контрольних тварин, а також в загальному стані організму та поведінці була відсутня.

Таблиця. Результати дослідження вірулентності *Lactobacillus* sp. 13/2

Матеріал для введення	Кількість мишей, гол.	Доза		Спосіб введення	Кратність введення	Кількість мишей, гол.		
		$см^3$	млрд. клітин			захворіло	загинуло	вижило
Суспензія активних клітин бактерій	7	0,5	1,0	в/ч*	1	0	0	7
	7	0,5	5,0	в/ч	1	0	0	7
	7	0,5	0,5	per os**	1	0	0	7
	7	0,5	1,0	per os	1	0	0	7
	7	0,5	5,0	per os	1	0	0	7
Контроль ізотонічний розчин	7	0,5	0	в/ч	1	0	0	7
	7	0,5	0	per os	1	0	0	7

Примітка:* в/ч- внутрішньочеревне введення, ** per os – введення через рот

Всі миші дослідних та контрольних груп після закінчення терміну спостереження були вбиті, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів. Результати розтину показали: серце – в межах анатомічної норми; легені в об'ємі не збільшені, легеневі долі легко відокремлюються одна від одної, поверхні гладенькі, спайок не відмічено; шлунок, петлі тонкого і товстого кишечнику зовні без змін, на розрізі малюнок слизової не змінений; печінка темно-червоного кольору, нормальної консистенції, середнього кровонаповнення, не збільшена, поверхня гладенька; нирки не збільшені, бобоподібної форми, поверхні гладенькі, на розрізі чіткий малюнок кіркової і мозкової зон, межа між зонами не згладжена; селезінка не збільшена, пружної консистенції, на розрізі пульпа помірно повнокровна і темного кольору.

За результатами мікробіологічних досліджень внутрішніх органів дослідних тварин через 15 діб після початку досліду було встановлено, що даний штам мікроорганізмів не інфективний, не дисемінує і не розмножується у організмі теплокровних.

Пероральне та внутрішньочеревне введення суспензії живих клітин культури штаму не спричинило інвазії бактерій у внутрішні органи тварин. Ретрокультури не виявлені.

Отримані результати свідчать про авірулентність штаму для досліджених теплокровних тварин ($ЛД_{50}$ в/ч >5 млрд. клітин/мишу, $ЛД_{50}$ per os >5 млрд. клітин/мишу).

Таким чином, згідно отриманих результатів та відповідних нормативних документів [3, 4, 7] штам *Lactobacillus* sp. 13/2 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин. Згідно даних щодо відсутності вірулентності, без урахування рівнів токсичності, токсигенності,

Продовження додатку Г

алергенності, дисбіотичної дії штам *Lactobacillus* sp. 13/2 може вважатися непатогенним.

Література
1. Директива 90/679 Ради Європейської економічної співдружності.
2. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів, видання 4-те, 1995.
3. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. Киев, 1982.
4. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды. М., 1991.
5. Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактерийных токсинов, ядов биологического происхождения. – МЗ СССР, 1980.
6. Постановка исследований для обоснования предельно-допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны. Методические указания. М., 1983.
7. Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки МОЗ України. Київ, 2004.

Завідувач лабораторії пробіотиків,
кандидат ветеринарних наук
старший науковий співробітник _____ Н.О. Кравченко

Провідний мікробіолог _____ О.М. Дмитрук

"6" квітня 2020 р.

Додаток Ґ

Додаток 7
до Інструкції про порядок депонування штамів мікроорганізмів в Україні з метою здійснення патентної процедури

СВІДОЦТВО

про первісне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Кому видано: Похилько Ю.М.

Поштова адреса Чернігівська обл. і р-н, с. Количівка, вул. 8 березня, б. 9

Цим підтверджується, що штам мікроорганізму:

Lacticaseibacillus rhamnosus ISMAV 13/2

первісно депонований в :

Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Реєстраційний номер, наданий штаму мікроорганізму Депозитарієм:

Lacticaseibacillus rhamnosus IMB B-7979

Супроводжувальна документація від депозитара одержана:

паспорт, лист

Дата первісного депонування: **25.11.2021**

Директор Інституту
мікробіології
і вірусології НАН України В.С. Підгорський

М.П.

Адреса:03143, Київ, вул. Заболотного, 154
www.imv.kiev.ua;
Golovacht@ukr.net, 044-294-69-60

25.11.2021

Додаток Д

«Погоджено» Директор Інституту сількогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН м. Чернігів _____ А.М. Москаленко «08» травня 2020 р.	«Затверджено» Директор ПП «ВИМАЛ-АГРО» с. Виблі Куликівського району Чергінівської області _____ О.В. Лазар «08» травня 2020 р.

АКТ

визначення ефективності використання штаму молочнокислих бактерій *Lactobacillus sp.* 13/2 при вирощуванні молодняка кролів на відгодівлі.

Ми, що нижче підписалися представник ПП «ВИМАЛ-АГРО» гол. агрономом Голубенко С. В. з однієї сторони та представники ІСМАВ НААН в особі аспіранта Похилько Ю.М. та завідувачки лабораторії пробіотиків Кравченко Н.О. склали даний акт про те, що на базі ПП «ВИМАЛ-АГРО» було проведено визначення ефективності використання штаму молочнокислих бактерій ***Lactobacillus sp.* 13/2** при вирощуванні кролів, що знаходяться на відгодівлі.

Випробування впливу штаму молочнокислих бактерій ***Lactobacillus sp.* 13/2**, виділено з щлунково-кишкового тракту кролів, на біологічну ефективність при відгодівлі кролів проводили на кролефермі **ПП «ВИМАЛ-АГРО»**. У дослідженні використовували новозеландських білих молодих кроликів. Тварини були розділені дві групи: контрольна група (n = 32) та експериментальна група (n = 34). Тваринам обох груп згодовували комбікорм гранульований для молодняка кроликів від 30 днів до забою ПК90 ЛЮКС (Україна). Тваринам дослідної групи до питної води додавали суспензію молочнокислих бактерій *Lactobacillus sp.* 13/2 (1×10^9 КУО/л), культивованих на гідролізованому молоці, в розрахунку 50 мл/л. Експеримент починався з відлучення кроленят від кролематки (35 днів) і тривав 49 днів. Результати випробувань представлені в таблиці.

Продовження додатку Д

Таблиця

Вплив штаму молочнокислих бактерій *Lactobacillus sp.* 13/2 на конвертацію корму та збереженість кролів відгодівельного періоду

Показник	Варіанти		Приріст, %
	Контрольна група, n=32/21	Дослідна група, n=34/27	
Середнє споживання корму при відгодівлі, кг на 1 кг приросту	3,66 ± 0,32	3,33* ± 0,22	-9,01
Випадки діареї, %	28,12	20,59	-7,53
Смертність, %	12,50	2,94	-9,56
Збереженість, %	87,50	97,06	+9,56
Забійний вихід, %	51,81 ±1,8	52,94±2,4	+1,13

Висновки: Новий штам молочнокислих бактерій позитивно зарекомендував себе при вирощуванні молодняка кролів відгодівельного періоду. Так збереженість тварин підвищилася на 9,56 %, випадки діареї молодняка кролів скоротилися на 7,53 % порівняно з контрольною групою, середнє споживання корму кроликами під час відгодівлі знизилося у дослідному варіанті на 9,01 %, встановлена тенденція до підвищення забійного виходу туші.

Акт складено у трьох примірниках.

Головний агроном
ПБП «ВИМАЛ-АГРО» _____С. В Голубенко

Завідувач лабораторії пробіотиків
ІСМАВ НААН
к. вет. н., _____Н.О. Кравченко

Аспірант ІСМАВ НААН _____Ю.М. Похилько