

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА
АГРОПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПОХИЛЬКО ЮРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ



УДК 604.4:579.64: 636.087.8: 636.92

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

03.00.20 – Біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Біла Церква – 2022

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Робота виконана в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України.

Науковий керівник – кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник

Кравченко Наталія Олександрівна,

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН України, завідувачка лабораторії пробіотиків

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук, професор

Бітюцький Володимир Семенович,

Білоцерківський національний аграрний університет, завідувач кафедри екології та біотехнології;

доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник,

Кушнір Ігор Михайлович,

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, завідувач лабораторії бактеріологічного контролю якості і безпеки ветеринарних препаратів.

Захист відбудеться «22» грудня 2022 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 27.821.01 у Білоцерківському національному аграрному університеті за адресою: 09117, Україна, Київської обл., м. Біла Церква, Соборна площа, 8/1, конференц-зала.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Білоцерківського національного аграрного університету за адресою: 09117, Україна, Київської обл., м. Біла Церква, Соборна площа, 8/1.

Автореферат розісланий «14» листопада 2022 р.

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради



М.М. Сломчинський

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Кролівництво – одна із перспективних галузей тваринництва, яка характеризується значними темпами відтворення поголів'я та швидкою окупністю вкладень у виробництво. Однак в Україні спостерігається зниження поголів'я кролів (Гончар О.Ф., 2013; Аксьонов, Є.О, 2016). Серед основних проблем, які заважають ефективному веденню кролівництва, важливе місце займають шлунково-кишкові захворювання тварин (Кудряшов А.А., 2017; Шевченко А.А., 2018). Також особливої уваги потребує питання збереження молодняку під час відлучення від кролематок. У цей період кроленята найбільш уразливі до дії патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (Licois D., 2004, Кононенко С.И., 2012, Гайнуллина М.К., 2014). Це пов'язано з їх ще не до кінця сформованим травним апаратом та імунною системою (Митрофанова В.А., 2017).

Враховуючи вищезазначене, у світі зріс інтерес до препаратів на основі живих мікробних культур – пробіотиків, які мають здатність оптимізувати метаболічні процеси організму, запобігати захворюванням шлунково-кишкового каналу (ШКК) та відновлювати нормальний баланс мікробіоти кишечника (Tariq M.S., 2005, Ноздрин Г.А., 2009, Тагиров Х.Х., 2012, Токарев И.Н., 2015). Найчастіше біоагентами пробіотичних препаратів є молочнокислі бактерії (МКБ), що проявляють антагоністичну активність (АА) до широкого спектру патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (Літвієнко В.М., 2017, Cameron A., 2019).

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 і кролів. Проте відомо, що прояв біологічних властивостей мікроорганізмів часто обумовлений джерелом їх виділення (Коваленко Н.К., 1991). У зв'язку з цим практичний інтерес становить створення пробіотичних препаратів на основі біологічно активних представників облигатної мікробіоти кишківника саме цих тварин.

З огляду на вищенаведене, вивчення біологічних властивостей нових, виділених від кролів штамів МКБ, перспективних для створення пробіотичних препаратів, є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано на базі лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва Національної аграрної академії наук України відповідно до планів завдання 05.00.03.03.Ф «Дослідити синтез біологічно активних речовин пробіотичними штамми 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»).

Мета та 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.

Методи дослідження. Поставлені завдання вирішували з використанням таких методів: мікробіологічні (виділення культур мікроорганізмів та їх ідентифікація, дослідження властивостей *in vitro*, *in vivo*), зоотехнічні (дослідження продуктивності тварин, збереженості поголів'я, конверсії корму), економічні (вивчення ефективності використання кормової добавки), математично-статистичні (оцінювання достовірності одержаних результатів).

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* IMB B-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-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2016), міжнародній науково-практичній конференції «Molecular microbiology and biotechnology» (Одеса, 2016), XI, XII, XIII наукових конференціях молодих вчених «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському

виробництві» (Чернігів, 2016, 2017, 2018, 2020, 2021), III Міжнародній науково-практичній 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), Young scientists conference «Youth and modern problems of microbiology and virology» (Kyiv, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 23 наукова праця, з них 6 – статті у наукових фахових виданнях України, 3 – статті в інших наукових виданнях України, 1 – стаття в закордонному збірнику, 13 – тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 131 сторінці основного тексту і складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновків та пропозицій виробництву, списку використаних джерел (421 посилання, з яких 276 – іноземною мовою) та додатків. Дисертація включає 31 таблицю і 13 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури за темою і вибір напрямів досліджень. На основі джерел літератури досліджено основні питання щодо складу та ролі мікробіоти шлунково-кишкового каналу. Особливу увагу приділено поняттю дисбактеріозу, проаналізовано його причини та наслідки. Описано пробіотичні препарати та ефективність їх застосування в кролівництві. Охарактеризовано біологічні властивості молочнокислих бактерій як потенційних мікроорганізмів для створення нових пробіотичних препаратів.

У результаті узагальнення наведених відомостей обґрунтовано необхідність дослідження представників облигатної мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів та пошуку перспективних штамів бактерій для створення пробіотичних препаратів.

Матеріал та методики досліджень. Наукову роботу виконано впродовж 2014–2017 років у Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. Дослідження проводили відповідно до загальної схеми (рис. 1).

Мікробіологічні дослідження проводили за стандартними методиками, а саме: висіву підготовлених десятикратних серійних розведень зразків на поживні середовища: капустяний агар (Квасников Е.И., 1975), MRS (De Man, Rogosa, Sharpe medium), знежирене молоко, Блаурокка, Ендо, МПА та Сабуро. Визначення належності ізолятів до МКБ проводили за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками. Видову приналежність МКБ попередньо вивчали за спектром зброджування вуглеводів. Молекулярно-генетичну ідентифікацію проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Молокозсідальну активність, питому швидкість росту, тривалість лаг-фази, константу швидкості поділу і термін регенерації визначали відповідно до загальноприйнятих методик (Бирюков В.В., 2004). Дослідження антагоністичної активності проводили *in vitro* дифузним методом блоків (Егоров Н.С., 1965). Для дослідження показнику азгезії використовувався метод, який базується на різниці оптичної щільності (Романов В.Е., 2009). З метою визначення здатності МКБ долати несприятливі умови травної системи, бактерії культивували на живильних середовищах з додаванням речовин, характерних для ШКК. Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) антибіотика проводили на рідкому середовищі MRS із додаванням антибіотиків (ампіциліну, бензилпеніциліну, еритроміцину, тетрацикліну, стрептоміцину), фіксуючи пробірки, у яких повністю відсутній ріст досліджуваних штамів. Диско-дифузійним методом визначали чутливість до антибіотиків у MRS-агарі з використанням стандартних паперових дисків, які просочені антибіотиками.

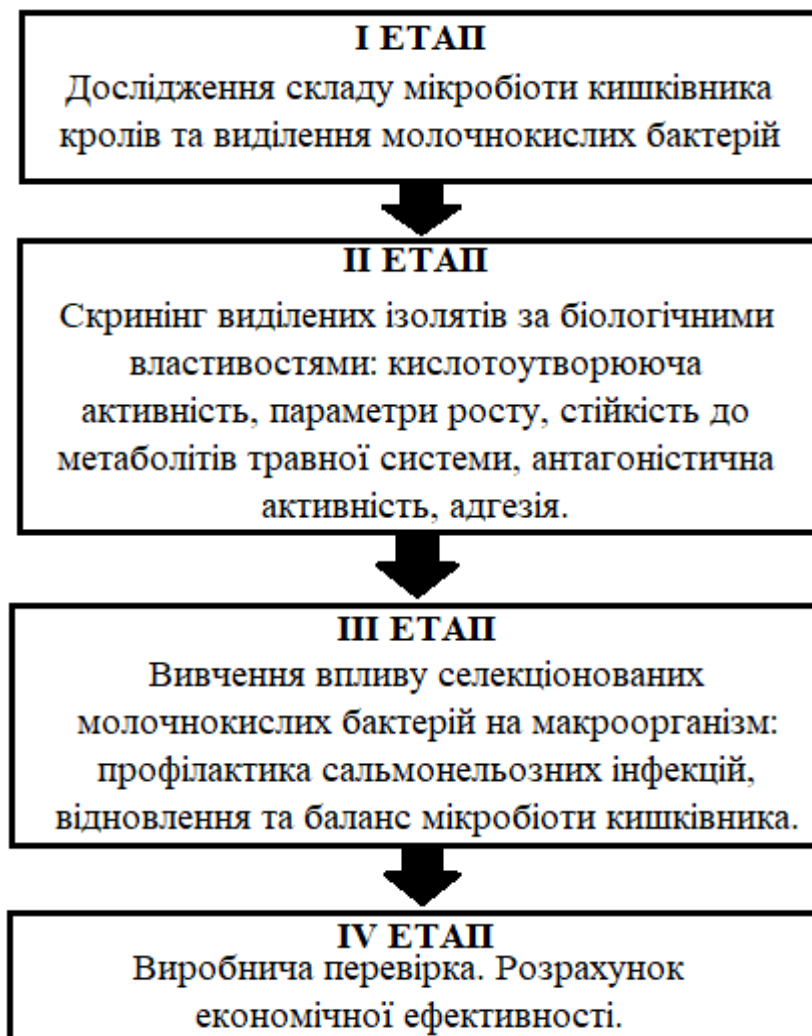


Рис. 1. Загальна схема досліджень

Дослідження на тваринах. Для дослідження складу кишкового мікробіоценозу молодняку кролів за різних типів годівлі, тварин розділяли на дві групи, тварин

першої групи годували за концентратним типом годівлі, другої групи — за комбінованим типом годівлі.

Для дослідження впливу компонентів дієти на склад мікробіоти кишківника молодняка кролів розділяли на три групи. Тваринам 1-ї дослідної групи згодовували переважно зелену масу лучних трав, 2-ї — сіно лучних трав, 3-ї — зерно пшениці та вівса.

Дослідження можливості використання бактерій роду *Lactobacillus* для профілактики сальмонельозних інфекцій проводили у дослідах *in vivo* на білих лабораторних мишах. Дослід 1: тваринам дослідної групи вводили суспензію МКБ упродовж 14-ти днів, потім тваринам дослідних і контрольних груп вводили збудник сальмонельозних інфекцій. Дослід 2: після введення тваринам збудників сальмонельозних інфекцій, тваринам контрольних груп вводили суспензію МКБ упродовж 14-ти днів.

Експеримент з відновлення та корекції балансу мікробіоти шлунково-кишкового каналу кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків, проводили на безпородних кролях. Після антибіотикотерапії тварини контрольної групи отримували ферментно-пробіотичну кормову добавку «Імунобактерин-D» (Україна), а тваринам дослідних груп до питної води додавали суспензію МКБ, у розрахунку 1 мл/л, 5 мл/л, 10 мл/л, 50 мл/л, 100 мл/л.

Зі тваринами під час експериментів поводитися відповідно до загальних етичних вимог щодо використання хребетних тварин у медичних і біологічних експериментах, на підставі рішення засідання комісії з питань етики та біоетики Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (протокол №1 від 21 липня 2015 року).

Оцінку ефективності МКБ при відгодівлі кролів досліджували на кролефермі ПП «ВИМАЛ-АГРО». У дослідженні використовували новозеландських білих кролів.

Економічну ефективність кормової добавки визначали загальноприйнятими методами.

Отримані дані були піддані математичній обробці методом варіаційної статистики (Плохинський Н.А., 1970) з використанням пакета програм Microsoft Excel і Office на ПК. Достовірність отриманих результатів визначали за допомогою t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Склад мікробіоти кишківника молодняка кролів за різних типів годівлі та дієти

Досліджено особливості складу мікробіоти кишківника молодняка кролів за основних типів годівлі (таблиця 1).

Відомо, що молочнокислі бактерії разом із біфідобактеріями — найбільш значущі представники ендогенної кишкової мікробіоти людини та тварин. Отримані результати свідчать, що чисельність МКБ у шлунково-кишковому каналі кролів перевищує чисельність біфідобактерій за всіх досліджуваних типів годівлі та дієти,

за винятком раціону зі значною часткою сіна, тому можна припустити, що їх функціональна роль більш значуща.

Таблиця 1

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

Групи мікроорганізмів	Тип годівлі		Дієта		
	Концентратний	Комбінований	Зелена маса	Сіно	Зерно
Біфідобактерії	$(5,8 \pm 0,6) \times 10^7$	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^6$ ^x	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^7$ ^y	$(7,4 \pm 1,5) \times 10^5$ ^y	$(3,5 \pm 0,9) \times 10^7$ ^y
МКБ	$(7,4 \pm 0,3) \times 10^8$	$(7,4 \pm 0,3) \times 10^8$	$(3,4 \pm 0,2) \times 10^8$	$(6,2 \pm 0,8) \times 10^5$ ^y	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^9$ ^y
Загальна кількість КП	$(5,8 \pm 0,3) \times 10^5$	$(8,7 \pm 0,7) \times 10^5$ ^x	$(6,4 \pm 0,3) \times 10^5$	$(2,2 \pm 0,3) \times 10^4$ ^y	$(5,0 \pm 0,7) \times 10^6$ ^y
Дріжджеподібні гриби	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^5$	$(9,8 \pm 1,2) \times 10^3$ ^x	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^4$ ^y	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^3$	$(3,4 \pm 0,7) \times 10^3$
Анаеробні бацили	$(2,2 \pm 0,3) \times 10^2$	$(3,0 \pm 0,5) \times 10^2$	$(5,0 \pm 0,7) \times 10^4$ ^y	$(5,4 \pm 0,7) \times 10^9$ ^y	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^2$

Примітка. x – P < 0,05 порівняно до концентратного типу годівлі; y – P < 0,05 порівняно до комбінованого типу годівлі.

Виділено 250 ізолятів МКБ, які за фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками було віднесено до бактерій роду *Lactobacillus*.

Відомо, що часто антагоністична активність (АА) МКБ обумовлюється дією основного продукту метаболізму – молочною кислотою. Тому первинний відбір ізолятів проводили за значенням кислотоутворення (рис.2). Встановлено значну кореляцію (Коефіцієнт кореляції Пірсона (r)=0,94) між титруємою та граничною кислотністю.

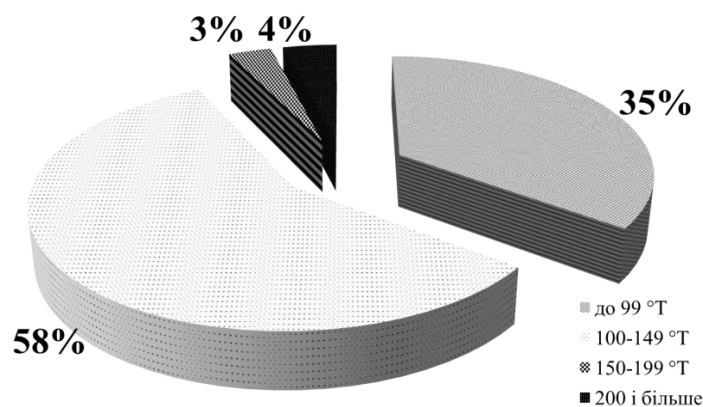


Рис. 2. Граничне кислотоутворення бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового каналу кролів

За культурально-морфологічними та біохімічними ознаками, відібрані ізоляти віднесено 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*.

Для того, щоб пробіотичний препарат позитивно впливав на макроорганізм, необхідним є забезпечення високої кількості життєздатних клітин. Технологічний процес виробництва препарату розпочинається з отримання біомаси пробіотичних бактерій, зокрема процесу культивування. Відмінності між ізолятами виявлено на підставі аналізу параметрів росту (табл. 2).

Таблиця 2

Параметри росту молочнокислих бактерій ($M \pm m$, $n=3$)

Назва ізоляту	Молокозсі-дальна активність, год	Чисельність бактерій, lg КУО/мл	Питома швидкість росту (μ_{max} , год ⁻¹)	Тривалість лаг-фази (T_l , год)	Константа швидкості поділу (v , год ⁻¹)	Термін регенерації (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

Загалом всі штами бактерій проявляли стабільність при культивуванні, тому їх можна вважати технологічними.

При використанні живих культур мікроорганізмів велика увага приділяється здатності цих мікроорганізмів виживати в умовах ШКК. Більша частина (80 %) досліджуваних ізолятів зберігали активність росту у живильному середовищі при зниженні рН до 4,0, а також високому вмісту натрій 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 %). Враховуючи вищезазначене, виділені нами штами можна вважати здатними витримати несприятливі умови шлунково-кишкового каналу.

Відомо, що однією з найважливіших вимог до пробіотичних мікроорганізмів є здатність пригнічувати ріст умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів. Високу антагоністичну активність (АА) до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів виявлено у досліджуваних ізолятів МКБ: L-4/1, L-5/4, L-13/2, L-17/2, L-17/3, L-49/1 (табл. 3). Найвищу АА встановлено у ізоляту L-13/2. При подальших дослідженнях встановлено, що на зони затримки росту тест-культур фактор кислотоутворення має непрямий вплив, коефіцієнт кореляції Пірсона (r) знаходиться в межах від -0,12 до 0,35. У зв'язку з чим, можна зробити висновок, що АА обумовлена продукуванням інших речовин, які проявляють бактерицидну дію, наприклад бактерицидами, перекисом водню та ін.

Окрім АА важливою властивістю пробіотичних штамів, що обумовлює ефективність пробіотику, є рівень адгезивної активності. Високий рівень адгезії пробіотичних бактерій сприяє колонізації слизової ШКК. Досліджувані ізоляти проявляли найвищий рівень адгезії до еритроцитів кроля, що в середньому становив

83 % (рис. 3). Одержані нами результати підтверджують судження про те, що для забезпечення максимального ефекту від використання пробіотичного препарату, його основу мають складати представники облігатної мікробіоти кишківника тварин, для яких цей препарат призначається.

Таблиця 3

Антагоністична активність молочнокислих бактерій ($M \pm m, n = 8$)

Досліджувані бактерії	Середні зони затримки росту умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів, мм								
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
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	23.0± ±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± ±0.7
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
<i>L. acidophilus</i> 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

Для використання мікроорганізмів як біоагентів пробіотичних препаратів необхідно встановити їх точне таксономічне положення. При подальших дослідженнях виявлено, що ізолят *Lactobacillus sp.* 13/2 (L-13/2) не містить генів, які наявні у більшості видів *L. acidophilus*, *L. helveticus*. Тому для визначення більш точного таксономічного положення *Lactobacillus sp.* 13/2 було проведено визначення нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК. Оцінка ідентичності гену 16S рРНК ізоляту *Lactobacillus sp.* 13/2 проводилася у порівнянні із відповідними послідовностями, депонованими в міжнародній базі даних GenBank. За результатами поліфазної таксономії встановлено приналежність даного ізоляту до виду *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

Вивчення антибіотикорезистентності *L. rhamnosus* 13/2 показало, що зазначений штам стійкий до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти.

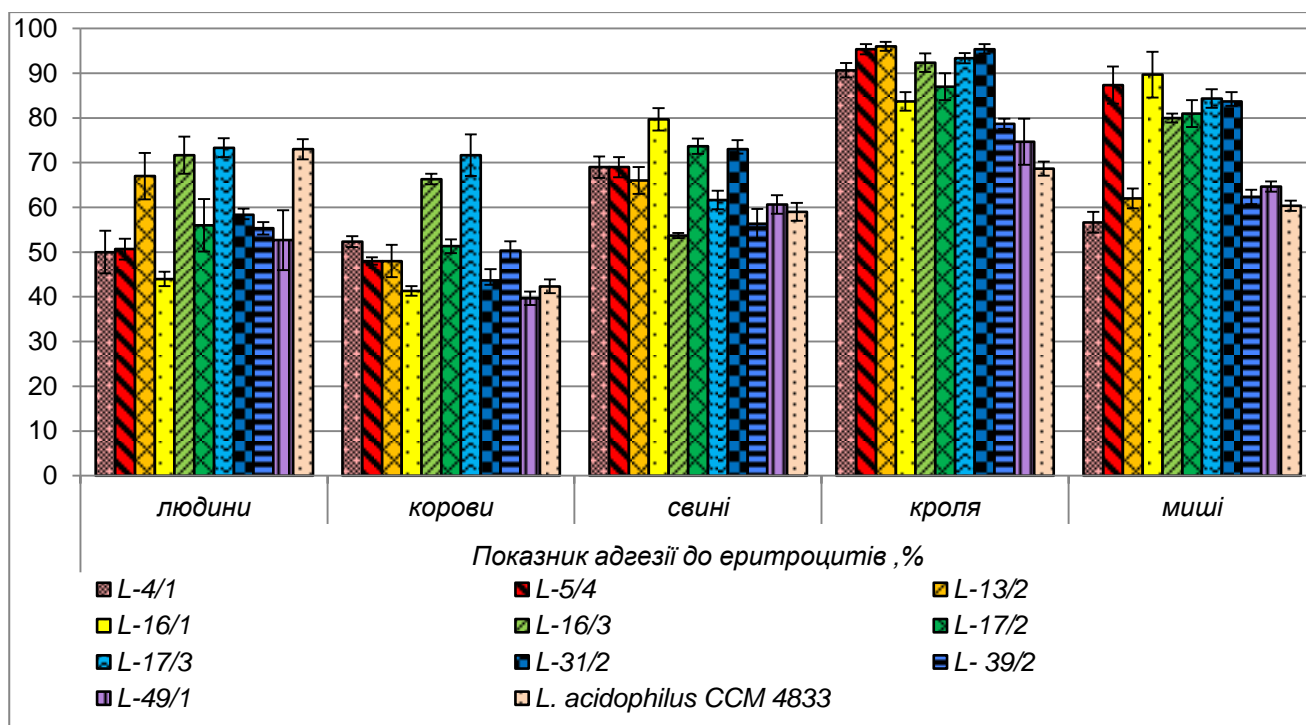


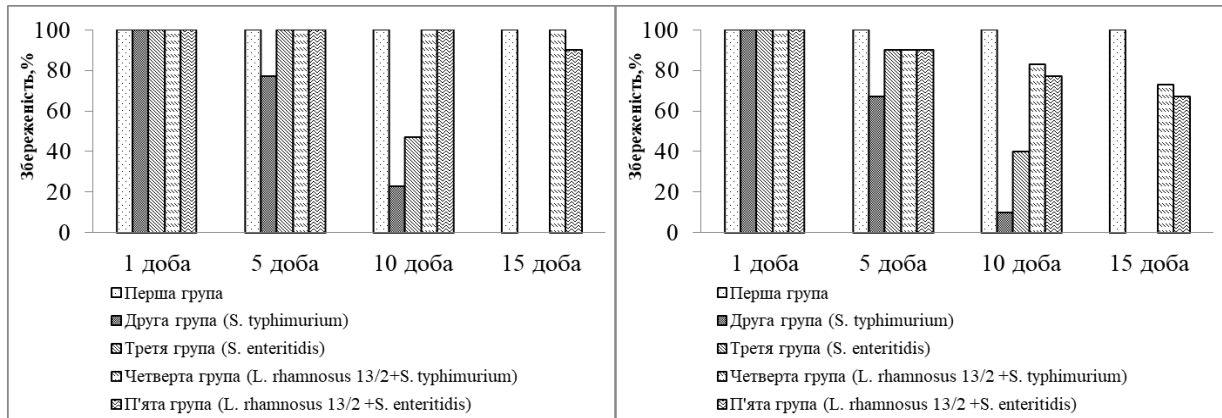
Рис. 3. Адгезивна активність молочнокислих бактерій до еритроцитів крові (M±m, n = 3).

За результатами дослідження безпечності активних життєздатних клітин *L. rhamnosus* 13/2 з використанням лабораторних статевозрілих білих мишей, встановлено авірулентність селекціонованого штаму. Даний штам є безпечним і може бути використаний як основа кормової добавки до раціону тварин.

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

Профілактичне введення тваринам штаму *L. rhamnosus* 13/2 упродовж 14-ти днів, перед введенням збудників сальмонельозних інфекцій, дало змогу забезпечити збереженість 100 % дослідних тварин у разі зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і 90 % – у разі *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* (рис. 4А).

Введення штаму *L. rhamnosus* 13/2 після інфікування збудниками сальмонельозу дало змогу зберегти 73 та 67 % дослідних тварин під час зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko*, відповідно (рис.4Б).



А

Б

Рис. 4. Ефективність використання штаму *L. rhamnosus* 13/2 для профілактики сальмонельозних інфекцій: А- перед інфікуванням збудниками сальмонельозу; Б- після інфікування збудниками сальмонельозу

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

Експериментально показано, що застосування штаму *L. rhamnosus* 13/2 обумовлює корекцію мікробіоти ШКК кролів у бік збільшення чисельності корисних мікроорганізмів та зменшення умовно-патогенних. Пролонговане 14-добове оральне введення кролям МКБ супроводжується не лише повним відновленням балансу мікробіоти ШКК, а також істотним збільшенням кількості біфідобактерій $((1,2 \pm 0,3) \times 10^7$ КУО/г) та МКБ $((0,7 \pm 0,1) \times 10^9$ КУО/г) у дослідних тварин порівняно з інтактними $((4,3 \pm 0,8) \times 10^6$ та $(3,1 \pm 0,1) \times 10^8$ КУО/г, відповідно).

Встановлена тенденція до зменшення чисельності дріжжеподібних грибів у дослідних тварин, за умови додавання до питної води бактеріальної суспензії *L. rhamnosus* 13/2 (1×10^9 КУО/мл) у дозі ≥ 10 мл/л.

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

У виробничому досліді встановлено (табл. 4), що пролонговане введення штаму *L. rhamnosus* 13/2 під час відлучення кроленят приводить до зниження смертності та витрати корму на 9,56 % та 9,00 %, відповідно. За рахунок чого зменшуються витрати на спожиті корми на 1,77 грн (5,00 %) на 1 гол. і собівартості 1 кг приросту на 1,98 грн (9,00 %). Використання кормової добавки позитивно впливає на збереженість поголів'я кролів, що обумовлює зниження недоотриманого прибутку до 277,08 грн (75,00 %). Використання кормової добавки є повністю окупним.

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

Показник	Контрольна група, n=32	Дослідна група, n=34
Смертність	4 (12,5 %)	1 (2,94 %)
Середнє споживання корму при відгодівлі (кг на 1 кг приросту)	3,66±0,32	3,33*±0,22
забійний вихід, %	51,81±1,8	52,94±2,4
Приріст маси тіла від 35 до 84 доби, г	1616±256	1673,25±203
Забійний вихід, %	51,81±1,8	52,94±2,4

Примітка. * – $P < 0,05$ порівняно до контрольної групи.

Технологія одержання кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2

За результатами проведених дослідів була розроблена біотехнологія отримання кормової добавки для кролів на основі пробіотичного штаму *L. rhamnosus* 13/2.

У біотехнологічному процесі одержання пробіотичних добавок враховано досягнення максимального виходу біомаси бактеріальних клітин, їх технологічність в умовах виробництва, стабільність при культивуванні та збереження біологічних властивостей. Запропоновано поживне середовище для культивування бактерій, захисне середовище під час висушування. Для зниження затрат при виробництві рекомендовано використовувати гідролізоване молоко.

Бактерії *L. rhamnosus* 13/2 вирощують за $37,0 \pm 2,0$ °C упродовж 24–48 год на середовищі гідролізоване молоко, вони довго зберігаються (до 5 років) у ліофільному стані.

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

Стартова культура систематично перевіряється за показниками, вказаними в паспорті.

Після культивування можливе утворення осаду. Після закінчення часу культивування, необхідно відібрати зразок для визначення чисельності МКБ. Надалі для підвищення рентабельності культуральну рідину необхідно розбавити стерильним фізіологічним розчином, щоб титр бактерій становив не менше 1×10^9 КУО/мл. Отриманий препарат може зберігатися продовж 12 місяців при температурі ≤ 4 °C.

Розроблена технологія виробництва не потребує спеціального обладнання і може бути реалізована на мікробіологічних підприємствах та підприємствах з виготовлення біологічно активних добавок.

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 $((5,8 \pm 0,6) \times 10^7$ КУО/г) та дріжджеподібних грибів $((1,2 \pm 0,2) \times 10^5$ КУО/г) у порівнянні з комбінованим $((4,2 \pm 0,2) \times 10^6$ та $(9,8 \pm 1,2) \times 10^3$ КУО/г, відповідно). Введення в раціон кролів значної частки сіна призводить до зменшення кількості біфідобактерій $((7,4 \pm 1,5) \times 10^5$ КУО/г) та збільшення кількості анаеробних бацил $((5,37 \pm 0,7) \times 10^9$ КУО/г). Раціон, основу якого складає зерно, приводить до підвищення кількості молочнокислих бактерій $((2,5 \pm 0,5) \times 10^9$ КУО/г) та зниження кількості дріжджеподібних грибів $((3,4 \pm 0,7) \times 10^3$ 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 °Т, 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 $(1,2 \pm 0,3) \times 10^7$ КУО/г, лактобактерій до $(7,0 \pm 0,1) \times 10^8$ 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 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. Пробиотичні 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. Ідентифікація 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 пробиотичного препарату для лікування та профілактики сальмонельозних інфекцій. Acta carpathica. 2015. № 24. Р.177–184. (Дисертант виконав експериментальні дослідження, провів аналіз одержаних результатів та підготував статтю до друку).

Матеріаліконференцій, 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. Антибіотикорезистентність 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 пробиотиків 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, 24-25 жовтня 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, 24-25 жовтня 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 молодняка 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.

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 зі спеціальності 03.00.20 «Біотехнологія». Білоцерківський національний аграрний університет, Біла Церква, 2021.

У дисертаційній роботі представлено науково-теоретичне обґрунтування використання пробіотичної кормової добавки на основі штаму молочнокислих бактерій, виділеного з травного тракту кролів та селекціонованого за низкою біологічних ознак. Представлені результати досліджень ефективності застосування штаму *L. rhamnosus* 13/2 у кролівництві та технологічну схему отримання пробіотичної кормової добавки на основі селекціонованого штаму молочнокислих бактерій.

Викладені результати мікробіологічного аналізу складу мікробіоти шлунково-кишкового тракту кролів за основних типів годівлі. Встановлено, що молочнокислі бактерії є значною часткою облигатної мікробіоти кішківника кролів незалежно від типу годівлі.

Виділено та досліджено 250 ізолятів бактерій роду *Lactobacillus*. На основі скринінгу, за комплексом біологічних властивостей відібрано штам *Lactobacillus sp.* 13/2, ідентифікований як *L. rhamnosus*.

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 кролів після антибіотикотерапії, що сприяє швидкому відновленню чисельності біфідобактерій та лактобактерій.

Встановлено, що використання пробіотичної кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2 за промислового вирощування кролів, приводить до зниження смертності та економії кормів, позитивно впливає на продуктивність молодняку кролів. Застосування пробіотичної кормової добавки на основі штаму *L. rhamnosus* 13/2 для кролів, що знаходяться на відгодівлі, сприяє відновлення 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 на 9 %.

Спостерігається позитивний економічний ефект, собівартість 1 кг приросту знижується майже на 9 % та недоотриманий прибуток знижується на 75 %.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, пробіотики, антагонізм, адгезія, мікробіота кишківника, кролі, продуктивність.

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.