



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма « Промислова біотехнологія»  
(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і  
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СОКОЛОВ Дмитро Олегович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Сучасні біотехнологічні підходи до одержання  
мультиштамових пробіотичних препаратів для ветеринарії

керівник роботи доц., к.т.н. Грегірчак Н.М.  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 782-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2022

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент: *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus*  
*licheniformis*, *Bacillus cereus*. Продукт: ветеринарний пробіотик.  
Геометричний об'єм ферментера: 2 м<sup>3</sup>. Коефіцієнт заповнення:  
0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Огляд літератури. Техніко-економічне обґрунтування.  
Обґрунтування етапів виділення та очистки продукту мікробного синтезу.  
Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по  
стадіях. Специфікація обладнання. Опис технологічної схеми. Контроль  
виробництва субстанції. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Проект  
технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна 1 аркуш формату А1. Технологічна схема: 1 аркуш формату  
А3

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Огляд літератури	15.02.2023 - 05.04.2023	
2.	Техніко-економічне обґрунтування виробництва продукту мікробного синтезу	10.04.2023- 30.04.2023	
3.	Обґрунтування етапів виділення та очистки продукту мікробного синтезу	01.05.2023- 15.05.2023	
4.	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	16.05.2023 – 12.06.2023	
5.	Специфікація обладнання	16.06.2023- 25.06.2023	
6.	Опис технологічної схеми	26.06.2023 – 19.07.2023	
7.	Контроль виробництва субстанції	20.07.2023 – 01.08.2023	
8.	Обґрунтування вибору технологічної схеми	03.08.2023 – 01.09.2023	
9.	Проект технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту	02.09.2023 – 01.10.2023	
10.	Графічна частина	12.10.2023 – 01.12.2023	
11.	Оформлення роботи та списку літератури	02.12.2023 - 20.01.2024	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Дмитро СОКОЛОВ**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Наталія ГРЕГІРЧАК**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Тема кваліфікаційної роботи стосується проектування виробництва мультиштамового ветеринарного пробіотику на основі штамів *Bacillus subtilis natto*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*. Проаналізувавши літературні відомості було обумовлено використання саме консорціуму представників роду *Bacillus*, завдяки оптимальній концентрації цільового продукту у препараті  $1 \times 10^8$  КУО/г при економічності процесу.

На вітчизняному ринку ветеринарних препаратів (за фармакотерапевтичними групами) біопрепарати, включаючи пробіотики, становлять 29,6% від загальної кількості препаратів, що застосовуються для тварин і птиці всіх видів. В ході обрахунку техніко-економічного обґрунтування визначили, що для забезпечення пробіотиком 5 000 000 бройлерів річна потреба складає 4,8 тонни пробіотику.

Технологічний процес виділення та очищення продукту мікробного синтезу на основі біомаси *Bacillus subtilis natto*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* передбачає етапи зберігання культури, виробничий біосинтез, а також стадії виділення та отримання висушеної біомаси.

Здійснено опис товарної форми препарату. Показники якості пробіотику для ветеринарії включають такі пункти: опис, автентичність, розчинність, прозорість, втрата в масі при висушуванні, специфічна нешкідливість, специфічна активність, мікробіологічна чистота, пакування, маркування, транспортування.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 8 розділів та списку використаної літератури. В роботі використано 104 літературних джерел, кількість сторінок – 90. Робота містить 6 таблиць.

**Ключові слова:** мультиштамовий пробіотик, *Bacillus subtilis natto*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, бройлери, біомаса, біосинтез, ліофільне висушування.

## ABSTRACT

The topic of the qualification work concerns the design of the production of a multistrain veterinary probiotic based on *Bacillus strains subtilis* natto , *Bacillus licheniformis* , *Bacillus cereus* \_ After analyzing the literature, it was decided to use a consortium of representatives of the genus *Bacillus* , due to the optimal concentration of the target product in the preparation of  $1 \times 10^8$  CFU/g with the economy of the process.

On the domestic market of veterinary drugs (by pharmacotherapeutic groups), biological drugs, including probiotics, make up 29.6% of the total number of drugs used for animals and poultry of all species. During the calculation of the feasibility study, it was determined that to provide probiotics to 5,000,000 broilers, the annual need is 4.8 tons probiotics.

Technological process of isolation and purification of the product of microbial synthesis based on *Bacillus* biomass *subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* involves the stages of culture storage, production biosynthesis, as well as the stages of isolation and production of dried biomass.

A description of the commercial form of the drug was made. Quality indicators of a probiotic for veterinary medicine include the following points: description, authenticity, solubility, transparency, loss in mass on drying, specific harmlessness, specific activity, microbiological purity, packaging, labeling, transportation.

The qualification work consists of an introduction, 8 chapters and a list of used literature. The work uses 101 non- source literature , the number of pages is 86. The work contains 6 tables.

**Keywords:** multistrain probiotic, *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, broilers, biomass, biosynthesis, freeze drying.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	10
1.1. Механізми дії пробіотичних штамів мікроорганізмів використовуваних у тваринництві.....	10
1.2. Застосування пробіотиків у ветеринарії.....	17
1.2.1. Аквакультура.....	18
1.2.2. Велика рогата худоба .....	22
1.2.3. Свинарство.....	25
1.2.4. Птахівництво .....	28
1.2.5. Інші тварини .....	31
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ .....	34
2.1. Потреба у цільовому продукті.....	34
2.2. Обґрунтування вибору біологічного агенту .....	36
2.3. Розрахунок річної потужності виробництва .....	41
2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу .....	43
2.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу .....	45
2.4.1. Обґрунтування форми випуску препарату, обґрунтування вибору всіх додаткових складових у препараті.....	45
2.4.2. Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки пробіотика .....	47
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ .....	49
РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	56
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ .....	59
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ.....	61
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ.....	64
РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ (ТУ) НА ВИПУСК ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	70

8.1. Основна характеристика мультиштамового пробіотика для ветеринарії .....	70
8.2. Показники якості пробіотика для ветеринарії .....	72
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	78

## ВСТУП

Пробіотики у ветеринарії використовуються завдяки антагоністичній активності щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, для забезпечення відновлення нормальної мікрофлори тварин. Тому вони широко використовуються для профілактики і лікування захворювань різного генезу у молодняка сільськогосподарських тварин та птиці. В якості пробіотичних штамів мікроорганізмів використовуються бактерії різних таксономічних груп, проте серед них перевага надається тим, що досліджуються у різних біотопах тварин з перших днів життя [1].

До організму тварин разом із кормом та водою часто потрапляє патогенна мікрофлора. Крім того, негативна зміна мікрофлори шлунково-кишкового тракту тварин може відбуватись в результаті різних несприятливих впливів: зміна раціонів харчування та складу комбікорму, порушення режимів годівлі, використання недоброякісних кормів. Зміни нормальної мікрофлори в негативний бік можуть відбуватись також під час та після лікування антибіотиками, тому в цьому випадку для відновлення мікрофлори доцільно вводити пробіотики [2].

Широкий спектр кормових добавок, таких як антибіотики, пробіотики, олігосахариди, ферменти та органічні кислоти, використовуються для покращення якості кормів у птахівництві. Такі кормові добавки підвищують ефективність засвоєння поживних речовин у складі корму. Раніше антимікробні стимулятори росту широко використовувались для підтримки та покращення здоров'я птиці у складі кормів, але останнім часом їх використання було заборонено через розвиток резистентних штамів патогенних мікроорганізмів. Тому сьогодні актуальним є використання пробіотиків, які допомагають при кишкових інфекціях за рахунок конкурентного виключення патогенів, хронічних запальних та алергічних

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Соколов Д.О.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					7	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



захворювань, а також відіграють важливу роль в імуномодуляції та імуностимуляції. В результаті застосування таких кормових добавок може знизити смертність та покращити швидкість розвитку, обмежити поширення патогенів серед птахів, що є економічно вигідним для птахівництва [3].

Нині досліджується включення пробіотиків до раціону птиці задля мінімізації ризиків зараження різноманітними патогенами. Дослідження свідчать, що застосування мультиштамових пробіотиків зумовлює зниження смертності та підвищення показників росту птиці.

Таким чином, пробіотики у ветеринарії використовуються у якості добавки для корму з метою стимулювання росту тварин та покращення засвоєння всіх необхідних речовин, а також навіть для боротьби з багатьма хворобами завдяки конкуренції з патогенною мікрофлорою. Вони є безпечною альтернативою добавки до корму, порівняно з антибіотиками. Так, розробка нових пробіотиків для ветеринарії, зокрема для птахівництва, є перспективними напрямом сучасних досліджень.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Механізми дії пробіотичних штамів мікроорганізмів використовуваних у тваринництві

Пробіотики – це живі штами мікроорганізмів, які, потрапляючи в травний тракт тварин, продуктами своєї життєдіяльності оптимізують наявний у ньому кількісний і якісний склад мікробіоти та виявляють стимулюючий вплив на її метаболічну активність. Найбільш використовуваними мікроорганізмами, які застосовують як пробіотики в годівельній практиці галузі тваринництва, є: молочнокислі стрептококи; дріжджові грибки; біфідобактерії; непатогенні штами кишкової палички, бацили, ентерококи та лактобактерії [4, 5].

За формою випуску пробіотики діляться на дві групи – рідкі та сухі [6].  
За технологією виготовлення пробіотичні препарати поділяють на такі види :

- пробіотики на основі живих непатогенних мікроорганізмів;
- пробіотики на основі метаболітів або складових компонентів непатогенної мікрофлори;
- пробіотики на основі сполук мікробного та іншого походження, які стимулюють метаболічну активність біфідобактерій і лактобацил у травному тракті тварин;
- пробіотики на основі структурних компонентів та метаболітів мікроорганізмів у різних комбінаціях, які стимулюють життєдіяльність непатогенної мікробіоти травного тракту тварин;
- пробіотики на основі штамів мікроорганізмів та їх структурних компонентів і метаболітів із заданими характеристиками, отриманих за допомогою генно-інженерних технологій;
- пробіотичні препарати на основі живих непатогенних мікроорганізмів,

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Соколов Д.О.			РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					9	24
Реценз.						Кафедра БТМ <sup>1</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

їх метаболітів, компонентів рослинного і тваринного походження, здатних виявляти стимулюючу дію на життєдіяльність корисної мікробіоти травного тракту тварин [4].

Основні причини використання пробіотиків:

1. низький рівень імунологічної реактивності та природної резистентності;
2. зниження життєздатності молодняка;
3. збільшення захворюваності та летальності;
4. для корегування дисбактеріозів;
5. для регулювання мікробіологічних процесів в стравохідному тракті;
6. для профілактики захворювань шлунково-кишкового тракту аліментарної та інфекційної етимології;
7. для прискорення росту молодняка і зменшення його відходу;
8. для підвищення біологічної повноцінності продукції [7].

Вважають, що основним механізмом дії пробіотиків є нормалізація складу та біологічної мікрофлори шлунково-кишкового тракту, позитивно впливаючи на склад мікробіоценозу, пробіотичні мікроорганізми також продукують біологічно активні речовини, зокрема амінокислоти [8].

За останнє десятиліття концепція пробіотиків зазнала значних змін. Зросла увага дослідників до структурних компонентів і продуктів метаболізму пробіотичних мікроорганізмів. Ці зміни пов'язані з розширенням уявлень про біологічну ефективність пробіотиків і відкриттям того, що структурні елементи клітин і їх метаболіти в деяких випадках виявляються не менш ефективними.

В даний час на ринку пробіотиків користуються попитом комбіновані препарати. Штами бактерій, які входять до складу комплексу пробіотиків, об'єднуються для виробництва різних ферментів, біологічно активних речовин, таким чином доповнюючи один одного в біологічній активності. Крім того, для отримання нових багатокомпонентних біологічно активних препаратів комбінують пробіотичні комплекси з пребіотичними

препаратами. Імобілізована форма пробіотичного препарату дозволяє істотно підвищити захист біфідобактерій і лактобактерій при проходженні через шлунок, де звичайні препарати, що містять ліофілізовані клітини пробіотиків, втрачають більше 90% активності. Біологічна ефективність сорбованих пробіотиків дозволяє використовувати зменшені дози бактерій. Стратегія створення пробіотичних препаратів спрямована насамперед на задоволення фізіологічних потреб тварин у біологічно активних речовинах. Додавання пробіотичних добавок до корму підвищує біодоступність поживних речовин, покращує здоров'я, імунітет, продуктивність і збереження сільськогосподарських тварин і птиці [8].

Позитивний вплив пробіотиків проявляється в скороченні тривалості токсичного впливу або підвищення стійкості до дії патогенних агентів. Механізми, завдяки яким пробіотичні препарати сприяють досягненню ряду метаболічних ефектів в організмі господаря, дуже різноманітні. Складові пробіотиків є представниками нормальної мікрофлори, а тому основними механізмами, що визначають їх ступінь та напрям оздоровчого впливу на організм хазяїна, є колонізаційна резистентність та імуномодулююча здатність, регуляція метаболічних процесів та детоксикаційна дія, антиканцерогенна активність. Ці функції реалізуються через ферментативну, вітамінсинтезуючу, антагоністичну та адгезивну активності. Штами бактерій пробіотиків продукують широкий спектр травних ферментів – амілазу, ліпазу, протеазу, пектиназу, ендоглюконазу і фітазу [9].

Антагоністична активність є надзвичайно важливою для пробіотичних штамів. Здатність молочнокислих та біфідобактерій пригнічувати розвиток мікроорганізмів інших таксономічних груп є однією з найважливіших біологічних властивостей цих мікроорганізмів. Механізм конкурентної боротьби з патогенами включає як продукування бацилами бактеріоцинів і молочної кислоти, так і створення збідненого субстратного середовища. Все це сприяє пригніченню росту патогенної мікрофлори. Крім того, бацили

стимулюють імунну систему господаря, збільшуючи вироблення імуноглобулінів.

Відомо, що пробіотичним препаратам властиві імунологічні і неімунологічні аспекти дії. Пробіотичні препарати впливають на кишкову мікрофлору шляхом стимуляції імунних механізмів слизової оболонки тонкої кишки і активізації імунних механізмів внаслідок антагонізму / конкуренції з потенційними патогенними мікроорганізмами. Імунні механізми позитивного впливу пробіотиків на організм господаря такі: активізують локальні мікрофаги для подальшої презентації антигену В-лімфоцитів, збільшують синтез секреторного імуноглобуліну А, модулюють вміст цитокінів, а також індукують розвиток гіпореактивності до харчових алергенів. Серед неімуних ефектів найбільше значення мають наступні дії: змінюють місцеве рН, створюючи несприятливі умови для розвитку патогенних мікроорганізмів, продукують бактеріоцини, які інгібують зростання патогенної мікрофлори, видаляють вільні радикали, стимулюють продукцію муцину слизової оболонки кишечника, покращують функціонування інтестинального бар'єра, конкурують за адгезію зі слизом та епітелієм з патогенами і модифікують патогенні бактеріальні ендотоксини.

Сьогодні пробіотичні культури важливий компонент для приготування комбікормів, адже їх позитивний вплив був неодноразово доведений. Пробіотики позитивно впливають на кишкову флору тварин, зменшують небезпеку виникнення у них шлунковокишкових захворювань і таким чином підвищують їх продуктивність.

Вплив пробіотиків різний:

- синтезують органічні кислоти, перекис водню й антибіотичні субстанції;
- синтезують ферменти й інші біологічно активні субстанції, які інактивують токсичні речовини;
- розмножуються у ШКТ та витісняють патогенні мікроорганізми;

- запобігають прикріпленню патогенних мікроорганізмів до стінки кишечника та їх розмноженню;
- сприяють розмноженню доміантної флори методом «конкурентного витіснення»;
- стабілізують склад мікрофлори;
- знижують бактеріальне перетворення завдяки встановленню оптимальної рівноваги між доміантною та субдоміантною флорою;
- сприяють мотильності кишечника, утворенню кишкових клітин;
- стимулюють імунну реакцію;
- сприяють засвоєнню поживних речовин, адже вони сприяють подовженню ворсинок та поглибленню крипт кишечника, а також зменшенню товщини слизової оболонки.

Однак не кожен штам здатний виконувати всі ці функції. Крім того, для позитивного ефекту необхідно, щоб достатня кількість пробіотичних бактерій досягла певного відділу травного тракту.

Більшість вчених, роботи яких присвячені дослідженню механізмів дії пробіотиків на організм тварин, акцентують увагу на тому, що пробіотичні продукти повинні характеризуватися чітко вираженою антагоністичною активністю до широкого спектру патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, бути сильними імуномодуляторами і продукувати бактеріоцини та ферменти. Бактерії, що входять до складу пробіотиків, повинні зберігати життєздатність при проходженні через шлунковокишковий тракт тварин і птиці, а також при виробництві комбікормів (наприклад, при гранулюванні) [9].

Пробіотики проявляють свою ефективність через різні механізми. Пробіотики пригнічують і контролюють кишкові патогени, а також покращують функціонування та продуктивність тварин. Основний спосіб дії пробіотиків включає [10]:

- інгібування адгезії патогенів;

- виробництво антимікробних компонентів, тобто бактеріоцинів і дефензинів;
- конкурентне виключення патогенних мікроорганізмів з організму тварин;
- посилення бар'єрної функції;
- зниження рН;
- модуляція імунної системи.

Пробіотики покращують стан здоров'я, пригнічуючи шкідливі бактерії. Наприклад, *Lactobacillus rhamnosus* і *Lactobacillus plantarum* можуть запобігти адгезії *Escherichia coli* в кишковому тракті. Бактерії зазвичай взаємодіють із клітинами-господарями після виділення хімічних сигналів, які впливають на наближення бактерій. Пробіотики можуть впливати на патогенність, змінюючи процес комунікації між патогенними бактеріями. Пробіотики виробляють антибактеріальні речовини та перешкоджають прикріпленню та транслокації бактерій. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* і біфідобактерії можуть виробляти білки або бактеріоцини, які мінімізують розвиток тісно пов'язаних бактеріальних організмів. Ці пробіотики зменшують кількість шкідливих мікроорганізмів у шлунково-кишковому тракті (ШКТ). Бактеріоцини - це біоактивні антимікробні пептиди, що утворюються в рибосомах багатьох бактерій і прилипають до клітин патогенних мікроорганізмів, проникаючи через фосфоліпідні мембрани. Основний механізм опосередкованої бактеріоцином патогенної реакції включає проникнення патогенних бактерій через цитоплазматичну мембрану, що призводить до інгібування синтезу ДНК і РНК та виходу вмісту клітин. Бактеріоцини можуть обмежувати здатність патогенних клітин колонізувати ШКТ і боротися зі стійкими до антибіотиків штамми бактерій [10, 11].

Імуномодулюючий механізм дії пробіотиків, пов'язаних зі станом здоров'я та захворюваннями тварин, є особливо важливим питанням у сучасній науці. Так, імуномодулюючий механізм дії пробіотиків базується на

вродженій або адаптивній імунній системі. Просвіт шлунково-кишкового тракту містить необхідні поживні речовини та корисні мікроорганізми, а також патогенні мікроорганізми, токсини та деякі чужорідні антигени. Епітеліальні клітини слизової оболонки ШКТ створюють вибірково проникний бар'єр між середовищем просвіту та внутрішніми тканинами організму. Цей бар'єр є першою лінією захисту хазяїна від шкідливих мікроорганізмів у шлунково-кишковому тракті (вроджений імунітет кишечника), але такі фактори, як стрес або захворювання, можуть порушити цей бар'єр. Певні пробіотичні мікроорганізми можуть підвищувати функцію кишкового бар'єру шляхом модуляції фосфорилування цитоскелетних білків і білків щільного з'єднання, впливаючи на взаємодію між клітинами слизової оболонки кишечника, а також на клітинну «стабільність». Відновлення бар'єрної функції слизової оболонки ШКТ за допомогою пробіотиків спостерігалось як на моделях *in vitro*, так і *in vivo*. Механізм може бути пов'язаний зі змінами в секреції слизу чи хлоридів, або зі змінами в експресії білків щільного контакту епітеліальними клітинами, однак деталі цього механізму дії досі не до кінця вивчені. З іншого боку, тварини можуть адаптувати імунну систему. Імунні відповіді тварин можна в певних випадках стимулювати (наприклад, у разі наявності інфекції або імунодефіциту) або ж пригнічувати (наприклад, у разі алергії чи при виникненні аутоімунних захворювань). Дослідження показали, що нормальна кишкова мікробіота шляхом стимуляції імунної відповіді шлунково-кишкового тракту (вироблення антитіл і підвищення фагоцитарної активності) може підтримувати захисні системи тварин від вторгнення патогенів. Встановлено два способи стимуляції імунної системи: вони можуть або мігрувати через стінку кишечника як життєздатні клітини, або розмножуватися в обмеженій мірі, а антигени, що вивільняються загиблими мікроорганізмами, поглинаються та безпосередньо стимулюють імунну систему господаря. Саме продукт цієї зміни додатково індукує імунну відповідь [12].



Органічні кислоти можна виділити як з рослинних, так і з тваринних тканин. Органічні кислоти можуть дифундувати в цитоплазму клітини. Кислота дисоціює в цитоплазмі клітини (рН приблизно 7) та знижує активність ферментів бактеріальної клітини, таких як декарбоксилази та каталази. Тварини з бактеріальними пробіотиками в кишечнику можуть виробляти додаткові органічні кислоти, такі як молочна та оцтова. Таким чином штами бактеріальних пробіотиків можуть сприяти зниженню рН у кишечнику. Це зумовлює сприятливість розвитку мікробіому, що супроводжується зменшенням колонізації патогенів. Крім того, пробіотичні штами є конкурентоспроможними та мають антагоністичні властивості, що негативно впливають на патогенні бактерії. Доведено, що органічні кислоти знижують кількість випадків некротичного ентериту. Некротичний ентерит є поширеною проблемою в птахівництві і викликається збудником *Clostridium perfringens* [13]. Так, одним з механізмів дії пробіотиків є зменшення колонізації патогенів шляхом стимулювання синтезу органічних кислот.

Таким чином, підсумувавши всю вищенаведену інформацію, основні механізми дії пробіотичних штамів мікроорганізмів, використовуваних у тваринництві, включають підвищення рівня резистентності організму тварин до захворювань, посилення життєздатності молодняка, корегування дисбіозів та росту тварин. Так, основними механізмами, що визначають ступінь та напрям оздоровчого впливу пробіотиків на організм, є колонізаційна резистентність та імуномодулююча здатність, регуляція метаболічних процесів та детоксикаційна дія, антиканцерогенна активність, які проявляються через ферментативну, вітамінсинтезуючу, антагоністичну та адгезивну активності пробіотичних штамів.

## **1.2. Застосування пробіотиків у ветеринарії**

Пробіотики у ветеринарії використовуються завдяки антагоністичній активності щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, для забезпечення відновлення нормальної мікрофлори тварин. Тому вони широко використовуються для профілактики і лікування захворювань різного генезу

у молодняка сільськогосподарських тварин та птиці. В якості пробіотичних штамів мікроорганізмів використовуються бактерії різних таксономічних груп, проте серед них перевага надається тим, що досліджуються у різних біотопах тварин з перших днів життя [14].

До організму тварин разом із кормом та водою часто потрапляє патогенна мікрофлора. Крім того, негативна зміна мікрофлори шлунково-кишкового тракту тварин може відбуватись в результаті різних несприятливих впливів: зміна раціонів харчування та складу комбікорму, порушення режимів годівлі, використання недоброякісних кормів. Зміни нормальної мікрофлори в негативний бік можуть відбуватись також під час та після лікування антибіотиками, тому в цьому випадку для відновлення мікрофлори доцільно вводити пробіотики [15].

Широкий спектр кормових добавок, таких як антибіотики, пробіотики, олігосахариди, ферменти та органічні кислоти, використовуються для покращення якості кормів у птахівництві. Такі кормові добавки підвищують ефективність засвоєння поживних речовин у складі корму. Раніше антимікробні стимулятори росту широко використовувались для підтримки та покращення здоров'я птиці у складі кормів, але останнім часом їх використання було заборонено через розвиток резистентних штамів патогенних мікроорганізмів. Тому сьогодні актуальним є використання пробіотиків, які допомагають при кишкових інфекціях за рахунок конкурентного виключення патогенів, хронічних запальних та алергічних захворювань, а також відіграють важливу роль в імуномодуляції та імуностимуляції [16].

### **1.2.1. Аквакультура**

На сьогодні використання пробіотиків в якості добавки до кормів для стимуляції росту та для боротьби з патогенною мікрофлорою актуально навіть в аквакультурі. Оскільки, деякі антибіотики, які використовуються в аквакультурі з цією метою, також застосовуються в медицині, що в подальшому може знижувати ефективність антибіотика при лікуванні

людини, як споживача. Також використання антибіотиків для лікування хвороб аквакультури спонукає до появи резистентних патогенів, що ускладнює процес лікування даним способом. Так, 5 штамів *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, два штама *Enterococcus* spp., один штам *L. plantarum* та один штам *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* були виділені з мікробіоти диких морських риб з метою подальшого їх використання у складі пробіотиків для аквакультури. Отримані штами показали антибактеріальну активність широкого спектра проти патогенів аквакультури, таких як *Vibrio harveyi*, *V. splendidus* та *Photobacterium damsela* [17]. Ahire зі співавт. проводили дослідження пробіотика з *L. helveticus* CD6 у якості добавки до корму золотих рибок *Carassius auratus*. Так, спостерігалось зниження смертності риб та покращення їх здоров'я [18].

Standen зі співавт. досліджували вплив мультиштамового пробіотика з таким складом, як *B. subtilis*, *E. faecium*, *L. reuteri*, *P. acidilactici* на тилапії (*Oreochromis niloticus*). Використання цього пробіотика покращує ріст та підвищує імунологічний статус кишечника тилапії [19]. Також використання у складі пробіотика *B. subtilis* E20 та *L. plantarum* 7-40 для краба (*Scylla paramamosian*) показало підвищення імунної відповіді та підвищення стійкості до хвороб [20].

Пробіотики використовувалися в аквакультурі для збільшення росту культивованих видів, однак повністю не досліджено – ці продукти підвищують апетит чи покращують засвоєваність. Виявлено, що пробіотичні мікроорганізми здатні колонізувати шлунково-кишковий тракт при введенні протягом тривалого періоду часу, оскільки вони мають вищу швидкість розмноження, ніж швидкість виведення, тому пробіотики прикріплюються до слизової оболонки кишечника риб, проявляючи свою активність. Їх дія залежить від таких факторів, як вид гідробіонтів, температура тіла, рівень ферментів, генетична стійкість та якість води [21].

Ефект пробіотиків був перевірений на фітопланктоні (мікрowodорості), який утворює основу водних харчових ланцюгів, завдяки своєму

фотосинтетичному механізму, що виробляє поживні речовини, який у більшості випадків вищі організми не здатні синтезувати, наприклад, у випадку поліненасичених жирних кислот і вітамінів. Серед груп мікроводоростей, що використовуються в аквакультури, виділяють центральні діатомові водорості, такі як *Chaetoceros* spp., що виявилися хорошим кормом для риб. Так, досліджено ріст пробіотика *Vibrio alginolyticus* C7b у присутності мікроводоростей *Chaetoceros muelleri*. Ці організми можна вирощувати разом в якості корму для креветок.

Коловертки незамінні в якості живого корму для більшості культивованих водних видів, завдяки своєму невеликому розміру вони проявляють більшу біодоступність. У літературі представлено відомості, що використання молочнокислих бактерій *Lactococcus casei* ssp. *casei*, *Pediococcus acidilactici* та *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* сприяє збільшенню росту коловертки *Brachionus plicatilis*.

Повідомлялося про використання пробіотиків як стимуляторів росту їстівних риб. Дієта нільської тиліпії (*Oreochromis niloticus*) була доповнена пробіотичним штамом *Streptococcus*, що значно підвищило вміст сирого протеїну та сирого ліпиду в рибі, а також супроводжувалось збільшенням ваги з 0,154 до 6,164 г за 9 тижнів вирощування. Зважаючи на комерційну важливість цього виду риб, ефект доповнення раціону пробіотиками збільшився на 115,3%.

Поліпшення росту декоративних риб досліджували з використанням мечохвоста (*Xiphophorus helleri*, *X. maculatus*) і гуппі (*Poecilia reticulata*, *P. sphenops*), їх корм доповнювали пробіотичними штамми *Bacillus subtilis* і *Streptomyces*, виявивши значне збільшення росту та виживання *Xiphophorus* і *Poecilia* через 90 та 50 днів прийому пробіотика відповідно.

Пробіотики також були успішно випробувані на вирощуванні молюсків. Так, виділили два штами дріжджів та один бактеріальний штам із травного тракту морського вушка (*Haliotis midae*). До дієти цього молюска було введено суміш трьох пробіотиків. Кожен пробіотик додавали до корму

для досягнення кінцевої концентрації приблизно  $10^7$  клітин на 1 г сухого корму. Швидкість росту маленького (20 мм) і великого (67 мм) морського вушка була покращена на 8% і 34% відповідно. Крім того, пробіотики сприяли підвищенню рівня виживання *Haliotis midae* з 25% до 62% відповідно [21].

Нещодавні дослідження Faturrahman et al. показали, що дієтичний пробіотик покращував швидкість росту молюска *Haliotis asinina*. Підвищення активності травних ферментів і поліпшення процесу травлення після лікування пробіотиками пояснюється виробленням позаклітинних ферментів, таких як протеази, карбогідролази та ліпази [22].

В аквакультурі пробіотики використовуються як альтернатива антибіотикам і речовинам хімічного походження. Хоча механізм антибактеріальної дії пробіотиків в аквакультурі ще належить визначити, багато досліджень показали, що пробіотики виробляють антибіотичні сполуки. Крім того, зниження рН після виробництва органічних кислот може пригнічувати ріст патогенних бактерій. Так, повідомлено про антибактеріальну активність *Bacillus licheniformis* і *B. pumilus*, які проявляли пробіотичну активність при низькому значенні рН та високій концентрації жовчі. Інше дослідження з *Bacillus licheniformis* CPQB засвідчило пригнічення *Vibrio alginolyticus* у білоніжних креветок. Було продемонстровано, що *Lactobacillus* spp. виробляють коротколанцюгові жирні кислоти, діацетил, гідропероксид і бактерицидні білки, які попередньо покращують імунну відповідь, а також зумовлюють стійкість до хвороб. Отже, пробіотики сприяють захисту водних тварин від інфікування патогенами, виробляючи антибіотичні сполуки [22].

Отже, наукові дані свідчать, що використання пробіотиків в аквакультурі є необхідною мірою для боротьби з антибіотикорезистентністю, покращення росту та імунологічного статусу тварин, стимулювання росту риб, молюсків та інших представників водного середовища.

### 1.2.2. Велика рогата худоба

Велика рогата худоба та дрібні жуйні тварини складають досить великий відсоток у фермерстві та домашньому господарстві. Крім альтернативи антибіотикам, пробіотики у цій сфері використовуються для покращення імунітету тварин, боротьби з інфекціями, кращого засвоєння поживних речовин, а також для покращення якості молока [23]. Adetoye зі співавт. виділили пробіотичні штами *L. salivarius* C86 та *L. amylovorus* C94 з фекалій великої рогатої худоби, які продемонстрували високу антимікробну активність щодо таких збудників харчових інфекцій, як *S. enterica* S1 та *S. enterica* S57 [24].

Дуже серйозною проблемою є поширеність шлунково-кишкових інфекцій у молодих телят через те, що коли тварини хворіють на цій стадії, їх подальший ріст та розвиток затримується. Причому частота кишкових захворювань зростає у системах інтенсивного вирощування, де вплив патогенів збільшується через утримання великої кількості тварин у невеликих приміщеннях. Тому актуальним є пошук способів вирішення наведеної проблеми [25]. Так, Renaud зі співавт. у своїх дослідженнях перевіряли ефективність використання *P. acidilactici*, *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum* у складі пробіотика з метою його застосування при діареї у молодих телят, що показало зменшення її тривалості [26].

З метою підвищення якості молока корів та збільшення його кількості канадські вчені Deng зі співавт. проводили дослідження впливу пробіотика (*L. sakei* FUA3089, *P. acidilactici* FUA3138, *P. acidilactici* FUA3140) в цьому напрямку, що в результаті дійсно показало ефективність його використання з вказаною метою [27]. Крім того, в наступних дослідженнях [28] для підвищення якості молока використовували пробіотик (*L. parafarraginis*, *L. buchneri*, *L. rari*, *L. zeae*, *Acetobacter fabarum*, *Candida ethanolica*), який розбризкували на пасовищі перед годівлею корів, що також показало позитивний результат.

Поява та прояв резистентності до антибіотиків спонукали до пошуку альтернатив антибіотикам, які мають вплив на ріст худоби. Оскільки різноманітність мікробіому рубця жуйних тварин тісно пов'язана зі здатністю тварини отримувати та засвоювати поживні речовини, ідеальні стимулятори росту мали б лише незначний вплив на природний мікробіом тварини, одночасно покращуючи ріст та розвиток тварин. Доведено, що багато тваринних пробіотиків покращують ефективність корму, продуктивність росту, утримання азоту, а також знижують ризик кишкових інфекцій [29].

Насамперед, пробіотики можуть покращити ріст епітеліальних клітин рубця та кишечника, що підвищує здатність поглинати поживні речовини. Пробиотики реалізують ці корисні ефекти, покращуючи виробництво жирних кислот, що діють як стимулятори росту епітеліальних клітин. З літератури відомо, що додавання пробіотиків *B. amyloliquefaciens* і *B. subtilis* покращило споживання корму та вироблення коротколанцюгових жирних кислот за рахунок збільшення кількості бактерій, що руйнують кишкову клітковину, включаючи *Proteobacteria*, *Rhodospirillaceae*, *Campylobacterales* і *Butyricimonas*. Інші дослідники виявили, що додавання комерційного пробіотичного препарату Enzimsprogin (що складається з *Bacillus subtilis* B-2998D, B-3057D і *Bacillus licheniformis* B-2999D) збільшувало приріст маси тіла овець і ягнят. Ефект стимуляції росту був пов'язаний із збільшенням кишкової популяції лактобацил і біфідобактерій та зменшенням кишкової палички, ентерококів і дріжджів у фекальному вмісті.

Стимулювання росту молочних тварин також пов'язане з вилученням та утриманням поживних речовин із наданого корму. Виявлено, що пробіотик *Bacillus amyloliquefaciens* H57 сприяє посиленню утримування азоту, споживання корму, збільшення ваги та зменшення викидів метану у жуйних тварин. Також у іноземній літературі представлено відомості про спостереження збільшення середньодобового приросту жуйних тварин, які отримували корм, доповнений комбінацією трьох пробіотиків, *Bacillus*

*licheniformis*, *Bacillus subtilis* і *Lactobacillus plantarum* в комплексі з полісахаридом. Пробиотичний ефект був опосередкований збільшенням відносної кількості фібробактерій, які сприяли ферментації білка рубця. Пробиотики можуть також націлюватися на фібролітичну еукаріотичну комменсальну мікрофлору для покращення використання азоту з грубих кормів. Phesatcha та ін. визначили вплив додавання *Saccharomyces cerevisiae* до раціону великої рогатої худоби. Результати дослідження показали, що додавання дріжджів підвищило харчову засвоюваність і ефективність виробництва азоту мікробним білком і поглинання азоту, одночасно збільшуючи популяцію фібролітичних грибів і знижуючи популяцію найпростіших. Ці результати свідчать про те, що пробиотики можуть покращити доступність поживних речовин і фізичний ріст, які підтримують продуктивність молочних тварин [29].

У Європейському Союзі зростає потреба в продуктах годівлі сільськогосподарських тварин, які можуть стати альтернативою антибіотикам, що активно використовувалися десятиліттями. Тому в останні кілька років використання пробіотиків почало збільшуватися. У дослідженні [30] було проведено опитування щодо практичного використання пробіотиків на угорських молочних фермах великої рогатої худоби та відповідного досвіду експертів. Результати показали, що 69,6% опитаних ферм використовували пробиотики, найчастіше спрямовані на оптимізацію бродіння в рубці, захист від стресових факторів і доповнення до медикаментозного лікування. Найпоширенішими очікуваними позитивними ефектами пробіотиків були більш ефективне вирощування телят, більший надій молока, більш стабільне бродіння в рубці та покращена стійкість до стресу. Власні експерименти компаній-дистриб'юторів показали, що пробіотичні продукти можуть покращити перетравність кормів, ефективність вирощування телят і репродуктивні показники корів. Однак в роботі зазначено, що досі існує потреба у поширенні відомостей про найбільш



ефективне використання пробіотичних продуктів для великої рогатої худоби [30].

Таким чином, у фермерстві та домашньому господарстві пробіотики є перспективною альтернативою антибіотикам, оскільки їх застосування дозволяє покращити імунітет великої рогатої худоби, боротьбу з інфекціями, кращезасвоєння кормів, а також супроводжується покращенням якості молока і м'яса.

### 1.2.3. Свинарство

Нині використання пробіотиків є досить популярним у свинарстві, що зумовлює постійні наукові пошуки вчених всього світу у цій сфері. Так, вчені Південної Кореї Lan зі співавт. використовували мультиштамовий пробіотик зі складом *Bacillus coagulance* (концентрація  $1 \times 10^{12}$  КУО/г), *B. lichenformis* (концентрація  $5 \times 10^{11}$  КУО/г), *B. subtilis* (концентрація  $1 \times 10^{12}$  КУО/г) та *Clostridium butyricum* (концентрація  $1 \times 10^{11}$  КУО/г) для досліджень його впливу на поросят-від'ємів, що покращило показники їх зростання, засвоюваність їжі та баланс кишкової мікрофлори, а також зменшили виділення шкідливих газів з фекаліями [31]. В інших дослідженнях [32] *Lactobacillus plantarum* L21, *L. plantarum* L80 та *L. paraplantarum* L103 аналізували у складі пробіотика для лікування інфекцій свиней, в результаті чого було показано високу протимікробну активність щодо таких збудників, як *Escherichia coli*, *Salmonella* групи В та *Salmonella* групи D. У наступній роботі [33] Ahmed зі співавт. перевіряли ефективність використання *L. probiotic* P1 та *B. probiotic* P2 у складі пробіотика для поросят, які були заражені *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* КСТС 2515 та *E. coli* КСТС 2571. Так, було показано позитивний вплив даного складу пробіотика на мікрофлору поросят. Крім того, в якості пробіотичних штамів вченими [34] були використані *Pediococcus acidilactici* MA18/5M та *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* SB-CNCM I-1079 для проведення досліджень їх впливу на мікрофлору свиней, що також показало позитивний результат. А також, мультиштамовий пробіотик, до складу якого входить *S. cerevisiae*

Y200007, *L. casei* ATCC 7469, *L. plantarum* ATCC 8014, *Enterococcus faecalis* UC-100, *E. faecium* NCIMB SF68, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29,521, *B. pseudolongum* ATCC 25,526, *B. subtilis* MA139, який використовувався як кормова добавка для свиноматок, показав високу ефективність у захисті їх організму від хвороб [35].

Для підвищення ефективності виробництва сучасна свинарська промисловість адаптувала деякі передові, але неприродні методи розведення, які можуть викликати певний стрес у свиней, спричиняючи зміни у складі кишкової мікробіоти та підриваючи стійкість свиней до патогенів. Незважаючи на те, що в літературі все ще немає узгодженості та важко зробити узагальнення щодо ефекту використання пробіотиків при вирощуванні свиней через різницю у використовуваних мікробних штаммах, застосованих дозах, тривалості лікування, а також методах господарювання, більшість літературних даних засвідчує, що введення пробіотичних штамів окремо або в комбінації значно покращує середньодобовий приріст, середньодобове споживання корму і коефіцієнт конверсії корму свиней [36].

Дослідження впливу пробіотиків на репродуктивну здатність свиней відносно обмежені. Однак дослідження, підсумовані Ahasan et al. показали, що деякі види пробіотиків (наприклад, з родів *Bacillus*, *Lactobacillus* і *Streptococcus*) покращують якість молозива, якість і кількість молока, розмір і життєздатність посліду, а також масу тіла поросят. Також повідомляється, що у вагітних свиноматок, які отримували пробіотик BioPlus 2B (містить *Bacillus licheniformis* і *B. subtilis*) за 2 тижні до передбачуваної дати опоросу та протягом періоду лактації, спостерігали покращену продуктивність посліду. Застосування пробіотика зумовило зменшення діареї поросят, зниження смертності перед відлученням та збільшення ваги при відлученні. Зменшення втрати ваги свиноматок під час лактації та виробництво молока з вищим вмістом жиру та білка були припущеними причинами покращення здоров'я та продуктивності поросят.

Багато пробіотичних бактерій, особливо молочнокислі, ферментують вуглеводи (лактоза) для виробництва коротколанцюгових жирних кислот, таких як молочна та оцтова, тим самим знижуючи рН просвіту до рівня, за якого відбувається загибель патогенів. Деякі види пробіотичних штамів також синтезують перекис водню, який пригнічує ріст грамнегативних бактерій. Доведено, що зниження рН кишківника метаболітами пробіотичних мікроорганізмів може частково компенсувати низьку секрецію соляної кислоти в шлунку відлучених поросят.

Крім органічних кислот, пробіотичні бактерії також можуть виробляти ряд інших речовин, включаючи антиоксиданти, антимікробні пептиди (дефензини), реутерин, бактеріоцини та мікроцин. Ці речовини можуть не тільки зменшити кількість життєздатних патогенних організмів, але й впливати на бактеріальний метаболізм і вироблення токсинів). Повідомлялося, що бактеріоцини, що виробляються молочнокислими бактеріями, здатні проникати через зовнішню мембрану грамнегативних бактерій і згодом інактивувати їх у поєднанні з іншими факторами навколишнього середовища, що посилюють антимікробну дію, такими як низькі температури, органічні кислоти та детергенти. Мікроцин, що виробляється пробіотиком *E. coli*, може обмежити ріст конкурентів у запаленому кишечнику, включаючи симбіотичну кишкову паличку, інвазивну *E. coli* та спорідненого збудника *Salmonella enterica* [36].

Дієтичні добавки різних пробіотиків (включаючи *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium thermophilus* і *Enterococcus faecalis*) зменшують тяжкість проходження діареї свиней. Пероральне введення *Bacillus subtilis* WS-1 у кількості  $1,5 \times 10^{10}$  КУО істотно пригнічувало діарею та смертність у поросят, спричинених патогенною *E. coli* [37].

Новонароджені поросята в групі лікування з 2 мл стерильного знежиреного молока, суспендованого із життєздатними *Lactobacillus rhamnosus* ( $5 \times 10^8$  КУО/мл), мали меншу частоту виникнення діареї при збільшенні ваги при відлученні. Метаболіти пробіотиків також можуть

пригнічувати реплікацію патогенів. Одним із основних компонентів метаболітів *Lactobacillus plantarum* є позаклітинні полісахариди, які підвищують рівень транскрипції та апоптозу фактора некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), пригнічуючи реплікацію вірусу епідемічної діареї свиней шляхом регулювання механізму апоптозу та індукування раннього апоптозу пошкоджених клітин [37].

Отже, у свинарстві пробіотики відіграють також важливу роль завдяки їх антимікробній та антиадгезивній дії, що сприятливо впливає на мікрофлору свиней, їх репродуктивну здатність, зумовлює стійкість організму до хвороб. Окрім цього, за введення пробіотиків спостерігали покращення середньодобового приросту, споживання корму та підвищення коефіцієнту конверсії корму свиней.

#### 1.2.4. Птахівництво

На сьогодні також перспективним є використання пробіотиків у птахівництві. Так, мультиштамовий пробіотик, у складі якого були *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. bifidum*, *L. rhamnosus*, *E. faecium*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Aspergillus oryzae*, *C. pintolopesii* показав позитивний вплив на мікробіоту бройлерів [38]. Також комбінація таких пробіотичних штамів, як *E. faecium*, *P. acidilactici*, *B. animalis*, *L. salivarius* та *L. reuteri* показала суттєве зменшення росту таких патогенів, як *Campylobacter jejuni* та *Salmonella enteritidis* в шлунково-кишковому тракті бройлерів [39]. В інших дослідженнях [40] вчені використовували у складі мультиштамового пробіотика для бройлерів *L. acidophilus*, *B. subtilis* DSM 17299 та *C. butyricum*, що показало покращення показників росту птиці, більшу засвоюваність амінокислот та зменшення кількості кишкової палички у сліпій кишці. В свою чергу Yang зі співавт. досліджували вплив *C. butyricum* на організм курчат-бройлерів. Результати показали, що даний мікроорганізм сприяє зростанню та імунній функції, а також покращує баланс кишкової мікрофлори у курчат-бройлерів [41]. Далі за допомогою мультиштамового пробіотику, який містить *S. cerevisiae*, *E.*

*faecium*, *L. acidophilus* та *B. subtilis*, була продемонстрована його користь у використанні в раціоні бройлерів для покращення імунітету та зниження вмісту *E. coli* у сліпій кишці [42]. В наступній роботі [43] два мультиштамових пробіотика («Protexin» – *E. faecium*, *L. delbruekii* subsp. *bulgricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *S. salivarius thermophilus*, *C. pintolopesii*, *A. oryzae*; «BioPoul» – *E. faecium*, *P. acidilactici*, *B. subtilis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *B. bifidum*, *S. cerevisiae*) були досліджені в якості альтернативи антибіотикам для покращення показників росту та морфології кишечника курчат-бройлерів. В іншій роботі [44] використання різних штамів *B. subtilis* покращили імунну активність кишечника та позитивно вплинули на цілісність кишкового бар'єру курчат-бройлерів.

На сьогодні бактеріальні інфекції є серйозною проблемою у птахівництві. Пташиний патоген *E. coli* АРЕС викликає захворювання, яке призводить до летального результату як у бройлерів, так і у курей-несучок і є основною причиною гибелі несучок в перший тиждень життя. Крім того, продукти птахівництва, такі як яйця, є поширеним джерелом *Salmonella enterica*, які є основною причиною госпіталізацій та смертей, пов'язаних з харчовими продуктами. Оскільки пробіотики можуть посилювати імунну відповідь, вони також застосовуються з метою усунення цієї проблеми. Так, Redweik зі співавт. використовували мультиштамовий пробіотик (*B. subtilis*, *L. acidophilus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *S. pastorianus*) в якості добавки до корму курчат, що показало ефективність застосування пробіотиків у зниженні зараження птиці [45].

В результаті застосування пробіотичних кормових добавок спостерігають зниження смертності та покращення швидкості розвитку, обмеження поширення патогенів серед птахів, що є економічно вигідним для птахівництва [16]. Так, наприклад, в останні роки вчені в своїх дослідженнях використовували у складі пробіотиків для бройлерів такі мікроорганізми, як: *Bacillus amyloliquefaciens* (концентрація  $1 \times 10^9$  КУО/г) [46]; *Lactobacillus*

*acidophilus* та *L. bifidobacterium* (концентрація  $0,1 \times 10^7$  КУО/Г) [16]; *L. acidophilus* LAP5, *L. fermentum* P2, *L. casei* L21, та *Pediococcus acidophilus* LS (концентрація  $1 \times 10^7$  КУО/Г) [47].

Крім того, нині досліджується включення пробіотиків до раціону птиці задля мінімізації ризиків зараження такими патогенами, як *Pasteurella multocida* та *Clostridium perfringens*. Reuben зі співавт. у своїй роботі оцінювали вплив мультиштамового пробіотику (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *P. acidilactici*, *Enterococcus faecium* та *Saccharomyces cerevisiae* – концентрацією  $1 \times 10^8$  КУО/Г) на ріст заражених збудником пташиної холери *P. multocida* бройлерів, в результаті чого знизилась смертність та підвищились показники росту дослідних птиць [48]. В інших дослідженнях [49] використовували *B. subtilis* DSM 32315 (концентрація  $1 \times 10^6$  КУО/Г) у складі пробіотика з метою оцінки його впливу на заражених *C. perfringens* бройлерів, який викликає некротичний ентерит. Було показано, що даний мікроорганізм позитивно впливає на мікрофлору птахів та послаблює негативний вплив вказаного патогену.

З економічної точки зору найбільш важливо, що від використання пробіотичних препаратів збільшується приріст живої маси і збереженість молодняка, знижуються затрати корму, підвищується продуктивність тварин і птиці. У птахівництві пробіотики використовують для збільшення продуктивності птиці в мінімальних дозах: близько  $10^6$  або  $10^7$  в 1 г. При цьому його вводять щодня, на протязі 1-2 місяців до отримання результату. Для пробіотику важливо постійно перебувати в порожнині кишечника в значній кількості для того, щоб отримати ефект [7].

За словами PR-менеджера ВАТ «Міронівський хлібопродукт» (МХП), власника торгової марки «Наша ряба», в основі корму для курчат-бройлерів – вирощена на власних полях кукурудза, а от добавки, що використовуються у кормі натурального походження. Це або пробіотики, або пробіотики – препарати створенні на основі органічних кислот.

В ході досліджень було виявлено, що використання пробіотичного препарату з високою концентрацією з перших днів життя курчат, сприяє нормальному формуванню мікрофлори кишечника, захищає організм від проникнення патогенної мікрофлори та їх токсинів, що в свою чергу впливає на покращення м'ясних якостей курчат: грудні м'язи по відношенню до живої маси в дослідній групі збільшилися на 1,2%; м'язи ножні, шкіра і кістки по відношенню до живої маси навпаки зменшилися на 0,4; 1,1 та 1,7% відповідно. Ці дані свідчать про те, що спостерігається позитивна кореляція між використанням пробіотичних препаратів та покращення м'ясних якостей курчат-бройлерів.

Так, використання такого пробіотичного препарату як «моноспорін» покращує збереженість курчат-бройлерів, знижує затрати корму на 1 голову на 1 кг приросту. «Моноспорін» розроблено на основі штаму «сінної палички», ізольованого з кишечника здорової тварини. Механізм дії препарату полягає в тому, що штам, який входить до його складу продукує антибіотичну субстанцію з високим спектром антибактеріальної та протигрибкової дії. Синтезує ліпази, лізоцим, а також пектолітичні і протеолітичні ферменти, які приймають участь як в дезінтеграції білку бактеріальних токсинів, так і в розщеплення клітковини, полісахаридів та підвищенні засвоюваності кормів [7].

Так, підсумувавши фактори позитивного впливу пробіотиків у птахівництві, за їх використання поліпшуються показники росту птиці, спостерігається більша засвоюваність амінокислот й інших біологічно важливих речовин з одночасною боротьбою з бактеріальними інфекціями птахів.

### **1.2.5. Інші тварини**

Дуже часто вчені проводять дослідження впливу пробіотиків на мишах або щурах. Так, пробіотик, який містить *L. acidophilus* LaVK2 та *B. bifidum* BbVK3, був оцінений в дії на моделі виразкового коліту, викликаного декстрансульфатом натрію у мишей, в результаті чого було показано

зниження активності хвороби [50]. Також в іншій роботі [51] досліджували вплив пробіотика (*L. plantarum* F44, *L. paracasei* F8, *B. breve* 46, *B. lactis* 8:8) на заражених збудником діареї та коліту *C. difficile* (CD) NAP1/027 мишах. Показано, що використання даного пробіотика забезпечує захист від вказаної інфекції. В наступній роботі [52] вчені для дослідження впливу на заражені збудником трипаносомозів (*Trypanosoma brucei*) щурах застосовували мультиштамовий пробіотик, у складі якого були *Bifidobacterium* BB-12, *L. acidophilus* LA-5, *L. delbrueckii* LBY-27, *L. paracasei* LC-01 та *Streptococcus thermophilus* STY-31. Лікування пробіотичними штамами давало позитивний ефект, але недостатньо імуностимулюючий.

Комплексна мікробіота шлунково-кишкового тракту кролика відіграє вирішальну роль у перетравленні корму, виробництві вітамінів, ферментативній активності з утворенням летких жирних кислот і стимуляції імунної відповіді, а також у захисті від інфекцій, патогенів і протидії екологічним стресам. Для запобігання розладам травлення кролівники використовують відповідні дієти для кролів, доповнені такими добавками, як пробіотики. Пробиотики можуть взаємодіяти з мікрофлорою кролів, що призводить до покращення стану здоров'я.

Так, було встановлено, що включення до раціону 0,5% пробіотика супроводжувалось зниженням смертності білих новозеландських кроликів (16,67%), у порівнянні з контрольною групою (27,78%). Подібне зниження смертності (-10,8%) також було відзначено у відлучених кроликів, отриманих від самок, яких годували пробіотиками. Такі результати поліпшення роботи травної системи можуть бути пов'язані з можливістю пробіотичних штамів колонізувати сліпу кишку та змінювати її фізико-хімічні характеристики – наприклад, підвищення окисно-відновного потенціалу.

Разом з тим, El-Shafei та ін. досліджували додавання пробіотиків *Lactobacillus plantarum* до раціону на новозеландських білих кроликів. Дослідники повідомили про відсутність значного впливу пробіотиків на загальний білок, імуноглобуліни та IgG. Результати, повідомлені Mohamed та



ін. частково збігались з вищевказаним, оскільки не було повідомлено про істотний вплив на глобулін, тоді як спостерігалось значне збільшення лейкоцитів і загального білка у зростаючих кроликів, в складі харчування яких був присутній штам *Lactobacillus acidophilus* [53].

Отже, такі результати дослідження використання пробіотиків на різних групах промислово важливих тварин відкриває перспективи покращення розвитку тваринництва, що супроводжуватиметься високими економічними показниками.

## РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

### 2.1. Потреба у цільовому продукті

Пробіотики відносяться до групи порівняно нових препаратів. У тваринництві раніше використовували різні мікробні кормові добавки, пробіотичні препарати ж містять живі мікроорганізми, такі як лактобацили, біфідобактерії, стрептококи. Принцип використання пробіотиків заснований на примусовому заселенні кишкового тракту штамами бактерій - пробіонтів, які здійснюють неспецифічний контроль за чисельністю умовно-патогенної мікрофлори шляхом витиснення її зі складу кишкової мікробіоти, а також затримування розвитку у цих мікроорганізмів патогенних факторів [54].

Основні причини використання пробіотиків:

1. низький рівень імунологічної реактивності та природної резистентності;
2. зниження життєздатності молодняка;
3. збільшення захворюваності та летальності;
4. для корегування дисбактеріозів;
5. для регулювання мікробіологічних процесів в стравохідному тракті;
6. для профілактики захворювань шлунково-кишкового тракту аліментарної та інфекційної етимології;
7. для прискорення росту молодняка і зменшення його відходу;
8. для підвищення біологічної повноцінності продукції [55].

За останнє десятиліття концепція пробіотиків зазнала значних змін. Зросла увага дослідників до структурних компонентів і продуктів метаболізму пробіотичних мікроорганізмів. Ці зміни пов'язані з розширенням уявлень про біологічну ефективність пробіотиків і відкриттям того, що структурні елементи клітин і їх метаболіти в деяких випадках виявляються не

	менш				НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва продукту мікробного синтезу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Соколов Д.О.						
Перевір.		Грегірчак Н.М.					33	15
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ефективними.

В даний час на ринку пробіотиків користуються попитом комбіновані препарати. Штами бактерій, які входять до складу комплексу пробіотиків, об'єднуються для виробництва різних ферментів, біологічно активних речовин, таким чином доповнюючи один одного в біологічній активності. Крім того, для отримання нових багатокомпонентних біологічно активних препаратів комбінують пробіотичні комплекси з пребіотичними препаратами. Імобілізована форма пробіотичного препарату дозволяє істотно підвищити захист біфідобактерій і лактобактерій при проходженні через шлунок, де звичайні препарати, що містять ліофілізовані клітини пробіотиків, втрачають більше 90% активності. Біологічна ефективність сорбованих пробіотиків дозволяє використовувати зменшені дози бактерій. Стратегія створення пробіотичних препаратів спрямована насамперед на задоволення фізіологічних потреб тварин у біологічно активних речовинах. Додавання пробіотичних добавок до корму підвищує біодоступність поживних речовин, покращує здоров'я, імунітет, продуктивність і збереження сільськогосподарських тварин і птиці [56].

Сьогодні пробіотичні культури важливий компонент для приготування комбікормів, адже їх позитивний вплив був неодноразово доведений. Пробіотики позитивно впливають на кишкову флору тварин, зменшують небезпеку виникнення у них шлунково-кишкових захворювань і таким чином підвищують їх продуктивність [57].

Сьогодні у зв'язку з активним розвитком птахівництва у світі отримання екологічно чистої продукції тваринництва є досить актуальним. Підвищення вимог до екологічної безпеки продукції тваринництва змусило переглянути методичні підходи до питань оптимізації контролю над епізоотичним процесом розповсюдження хвороб, збудниками яких є умовно-патогенна мікрофлора і визнати необхідність розробки нового покоління екологічно безпечних препаратів, здатних зайняти своє місце в системі заходів щодо забезпечення біологічної захисту сільськогосподарських тварин

і птиці. Такими препаратами є новітні пробіотики, одержані на основі представників нормальної коменсальної мікрофлори – лакто- та біфідобактерій з антибактеріальними та імуномодулювальними властивостями [58].

На вітчизняному ринку ветеринарних препаратів (за фармакотерапевтичними групами) біопрепарати, включаючи пробіотики, становлять 29,6% від загальної кількості препаратів, що застосовуються для тварин і птиці всіх видів. Причиною дисбалансу в потребі і використанні пробіотичних препаратів саме у птахівництві є недостатня кількість вискоєфективних, недорогих пробіотичних препаратів. Питання оздоровлення, підвищення загальної резистентності організму птиці, підвищення їх продуктивності за допомогою пробіотиків дуже перспективне, але водночас і складне, та потребує проведення ґрунтовних та фундаментальних наукових досліджень [58].

## **2.2. Обґрунтування вибору біологічного агенту**

Курчата-бройлери вирощуються і широко споживаються у всьому світі, оскільки вони можуть забезпечити людей високоякісним м'ясом та яйцями. Таким чином, світовий попит на куряче м'ясо з кожним роком продовжує значно зростати. Тим часом, через згубну побічну дію антибіотиків у птахівництві, а також на здоров'я людини як споживача, все більше країн відмовляються від антибіотиків-стимуляторів росту, які раніше використовувались в якості стимуляторів для підвищення показників росту тварин та гальмування поширення деяких захворювань. Загалом, пробіотики, як альтернатива антибіотикам, корисні для показників росту та здоров'я курчат, наприклад, для збільшення живої маси, ефективності конверсії корму, покращення імунної відповіді, підвищення стійкості до бактеріальних інфекцій та регулювання кишкової мікрофлори [59].

На сьогоднішній день вченими активно досліджуються як одноштамові, так і мультиштамові пробіотики. Проте, перевага надається більше мультиштамовим пробіотикам, які містять велику кількість різних

штамів мікроорганізмів. Це відбувається тому, що завдяки використанню більшої кількості штамів, збільшується спектр ефективності їх дії та позитивних синергетичних ефектів на організми тварин [60].

Одним з прикладів дослідження впливу мультиштамового пробіотика на бройлерів є використання у його складі різних пробіотичних штамів роду *Bacillus* [61]. Також є схожі дослідження, де оцінюють вплив у складі пробіотика мікроорганізмів роду *Lactobacillus* [62]. Крім того, представники роду *Pediococcus* також використовувались для досліджень у складі мультиштамового пробіотика для бройлерів [63].

Узагальнюючу характеристику особливостей одержання мультиштамових пробіотиків для бройлерів наведено у табл. 2.1. Так, ми можемо проаналізувати, що концентрацію титру бактерій у цільовому продукті мають більшу штами родів *Lactobacillus* та *Pediococcus* ( $1 \times 10^{10}$  КУО/г), порівняно з родом *Bacillus* ( $1 \times 10^8$  КУО/г). Проте, тривалість культивування найменша у пробіотичних штамів роду *Bacillus* (12 год), порівняно з іншими.

Таблиця 2.1

### Особливості одержання мультиштамових пробіотиків для ветеринарії

Пробіотичні штами	Склад поживного середовища (г/л)	Концентрація цільового продукту у препараті (КУО/г)	Умови культивування (тривалість, температура)	Література
<i>Bacillus subtilis</i> natto, <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	пептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, хлорид натрію – 0,5	$1 \times 10^8$	12 год, 37°C	Gong L., Wang B., Mei X., Xu H., Qin Y., Li W., Zhou Y. Effects of three probiotic <i>Bacillus</i> on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. <i>Anim. Sci. J.</i> 2018, 89(11), 1561-1571. doi: 10.1111/asj.13089.

<p><i>Lactobacillus plantarum</i> A37, <i>Lactobacillus plantarum</i> МІІІ</p>	<p>казеїновий пептон – 10, м'ясний екстракт – 8, дріжджовий екстракт – 5, глюкоза – 20, фосфат калію двозаміщений – 2, цитрат амонію – 2, ацетат натрію – 5, сульфат магнію – 0,2, сульфат марганцю – 0,05, полісорбат-80 – 1</p>	<p><math>1 \times 10^{10}</math></p>	<p>14 год, 37°C, pH 5,7</p>	<p>Gao J., Wang R., Liu J., Wang W., Chen Y., Cai W. Effects of novel microecologies combined with traditional Chinese medicine and probiotics on growth performance and health of broilers. <i>Poult. Sci.</i> 2022, 101(2), 101412. doi: 10.1016/j.psj.2021.101412.</p>
<p><i>Pediococcus acidilactici</i> SH8, <i>Pediococcus pentosaceus</i> NP 6, <i>Pediococcus pentosaceus</i> CH 403</p>	<p>казеїновий пептон – 10, м'ясний екстракт – 8, дріжджовий екстракт – 5, фосфат калію двозаміщений – 2, цитрат амонію – 2, ацетат натрію – 5, сульфат магнію – 0,2, сульфат марганцю – 0,05</p>	<p><math>1 \times 10^{10}</math></p>	<p>48 год, 42°C</p>	<p>Khochamit N., Siripornadulsil S., Sukon P., Siripornadulsil W. <i>Bacillus subtilis</i> and lactic acid bacteria improve the growth performance and blood parameters and reduce <i>Salmonella</i> infection in broilers. <i>Vet. World.</i> 2020, 13(12), 2663. doi: 10.14202/vetworld.2020.2663-2672.</p>

Вказана вище характеристика біологічних агентів є недостатньо для правильного вибору пробіотичних штамів. Тому далі в табл. 2.2 наведено вартість компонентів поживного середовища для культивування вище вказаних пробіотичних штамів. Так, з даних цієї таблиці видно, що найдешевшим поживним середовищем для культивування є середовище для вирощування пробіотичних штамів роду *Bacillus*.

**Вартість компонентів поживного середовища для  
культивування пробіотичних штамів**

Пробіотичні штами	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Bacillus subtilis</i> natto, <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	пептон	2400	24	1
	дріжджовий екстракт	4377	21,9	2
	хлорид натрію	25	0,02	3
	Вартість 1 л середовища – 46 грн			
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> A37, <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> МІІІ	казеїновий пептон	17365.2	173,7	4
	м'ясний екстракт	7296	58,4	5
	дріжджовий екстракт	4377	21,9	2
	глюкоза	173	3,5	6
	фосфат калію двозаміщений	156	0,4	7
	цитрат амонію	40	0,1	8
	ацетат натрію	139	0,7	9
	сульфат магнію	76	0,1	10
	сульфат марганцю	58	0,1	11
	полісорбат-80	470	0,5	12
	Вартість 1 л середовища – 260 грн			
<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> SH8, <i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i> NP6, <i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i> CH403	казеїновий пептон	17365.2	173,7	4
	м'ясний екстракт	7296	58,4	5
	дріжджовий екстракт	4377	21,9	2
	фосфат калію двозаміщений	156	0,4	7
	цитрат амонію	40	0,1	8
	ацетат натрію	139	0,7	9
	сульфат магнію	76	0,1	10
	сульфат марганцю	58	0,1	11
Вартість 1 л середовища – 256 грн				

**Примітка.** \* – Ціни наведено станом на січень 2022 р.

- [http://agar.com.ua/Additives\\_for\\_microbiology\\_ru/Peptone\\_fermentative](http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Peptone_fermentative),
- <https://shop.hlr.ua/drojjevoy-ekstrakt-500-g-conda-144107.html>,
- <https://novohim.com.ua/catalog/budivelna-ximiya/natrij-xloristij-chistyj/>,

4. <https://shop.hlr.ua/pepton-kazeinovy-tripton-dbiotehnologii-fermtech-1-kg-234209.html>,
5. <http://lab-mir.com/index.php/%D0%BA%D0%B0%D1%82%D0%B0%D0%BB%D0%BE%D0%B3/%D0%BF%D0%B8%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B5-%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%8B/%D0%BF%D0%B8%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D0%B5-%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%8B-%D0%BF%D1%80-%D0%B2%D0%B0-%D0%B8%D0%BD%D0%B4%D0%B8%D1%8F/39448-detail.html>,
6. <https://33korovy.in.ua/product/glyukoza-poroshok-1-kg-ukrvetbiofarm>,
7. <https://www.systopt.com.ua/item-kalij-fosfornokyslyj-kaliyu-fosfat-2-zamishhenyj>,
8. [https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ammonium\\_citrate/](https://www.covalent.com.ua/ru/shop/ammonium_citrate/),
9. <https://novohim.com.ua/catalog/promislova-ximiya-j-sirovina/natrij-octovokislj-acetat-natriyu/>,
10. <https://7sotok.com.ua/ua/p1281012686-udobrenie-sulfat-magniya.html>,
11. <https://www.systopt.com.ua/item-marganets-sirchanokyslyj-sulfat-margantsyu>,
12. <https://beurre.ua/emulgator-polisorbat-80> .

З метою уточнення загальної картини у виборі пробіотичних штамів доцільним є розрахунок умовної вартості 1 г цільового продукту, які наведені далі в табл. 2.3. Так, умовна вартість 1 г біомаси штамів роду *Bacillus* є найдешевшою.

Таблиця 2.3

**Умовна вартість 1 г цільового продукту з використанням різних пробіотичних штамів**

Пробіотичні штами	Вартість 1 л середовища, грн	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год
<i>Bacillus subtilis</i> natto, <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	46	9,2	12
<i>Lactobacillus plantarum</i> A37, <i>Lactobacillus plantarum</i> МІІІ	260	173,3	14



<i>Pediococcus acidilactici</i> SH8, <i>Pediococcus pentosaceus</i> NP6, <i>Pediococcus pentosaceus</i> CH403	256	85,3	48
---	-----	------	----

Проаналізувавши всі дані з трьох вище наведених таблиць, можна зробити висновок, що найвигіднішим варіантом серед наведених є використання у складі мультиштамового пробіотика для бройлерів штамів роду *Bacillus*.

### 2.3. Розрахунок річної потужності виробництва

Щорічно фермерські та присадибні господарства України утримують близько 150 млн голів курчат-бройлерів [64]. Зважаючи на те, що на вітчизняному ринку вже наявні референтні пробіотичні препарати, що складають конкуренцію, прийmemo, що будемо забезпечувати пробіотиком на основі *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis* та *Bacillus cereus* 1/30 частку бройлерів від загальної кількості, що утримуються на фермерських та присадибних господарствах України.

$$150\,000\,000 / 30 = 5\,000\,000 \text{ голів}$$

Згідно інструкції до застосування референтного препарату Імунобактерин D, норма застосування препарату для бройлерів становить 0,2-0,4 кг на 1 тону корму. Приймаємо середнє значення – 0,3 кг на 1 т корму [65].

Норма споживання корму бройлерами складає від 25 до 160 г на день в залежності від віку птиці. Для розрахунків приймаємо середнє значення 80 г корму на день [66].

До забою бройлер готовий у віці близько 40 днів [67].

Отже, за 40 днів життя бройлер споживає:

$$80 \text{ г} \times 40 \text{ днів} = 3200 \text{ г} = 3,2 \text{ кг}$$

Тоді 5 000 000 бройлерів споживають:

$$3,2 \text{ г} \times 5\,000\,000 \text{ голів} = 16\,000\,000 \text{ кг} = 16\,000 \text{ тонн корму}$$

Якщо норма введення пробіотика становить 0,3 кг на 1 т корму, то на 48 000 тонн корму кількість пробіотика складає:

$$0,3 \text{ кг} \times 16 \text{ 000 тонн} = 4,8 \text{ тонни}$$

Таким чином, для забезпечення пробіотиком 5 000 000 бройлерів протягом 40 днів необхідно 4,8 тонни пробіотика.

Пробіотик, який обрано для подальших розрахунків, містить *Bacillus subtilis natto*, *Bacillus licheniformis* та *Bacillus cereus*.

*Bacillus subtilis* синтезує 4,5 г/л біомаси [68].

*Bacillus licheniformis* синтезує 8 г/л біомаси [69].

*Bacillus cereus* синтезує 0,2 г/л біомаси [70].

Розрахуємо сумарну концентрацію цих штамів в 1 л культуральної рідини:

$$4,5 + 8 + 0,2 = 12,7 \text{ г/л}$$

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини для отримання 4800 кг (4,8 тонни) пробіотика.

$$\frac{4800}{0,0127} = 377 \text{ 952 л}$$

Врахуємо сумарні втрати цільового продукту при виробництві (10 %), тоді необхідна кількість культуральної рідини:

$$V_{кр} = 377 \text{ 952 л} / (1-0,1) = 419 \text{ 946 л}$$

Приймаємо кількість робочих трудоднів ( $T_{рд}$ ) 290. Тоді кількість продукту на добу ( $V_{д}$ ) становитиме:

$$V_{д} = V_{кр} / T_{рд} = 419 \text{ 946} / 290 = 1448 \text{ л}$$

Визначаємо кількість виробничих циклів на рік:

$$N_{ц} = V_{кр} / ((V_{д} \times T_{цф}) / 24) = 419 \text{ 946} / ((1448 \times 18) / 24) = 386 \text{ циклів,}$$

де  $T_{цф}$  – цикл роботи ферментера (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація апарату – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 12 год).

Далі розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, ( $V_{крц}$ ):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \times V_d \times T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \times 1448 \times 18 / 24 \approx 1200 \text{ л,}$$

де  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій .

Геометричний об'єм ферментера для отримання 1200 л культуральної рідини з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_r = V_{\text{крц}} / K_{\text{зап}} = 1200 / 0,6 = 2000 \text{ л,}$$

де  $K_{\text{зап}}$  – коефіцієнт заповнення ферментера.

### **2.3.1. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу**

#### Розрахунок кількості стадій отримання посівного матеріалу для вирощування культури у ферментері 2000 л

За виробничий цикл отримують  $V_{\text{кр}} = 1200$  л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = \frac{V_{\text{кр}}}{1 - E_{\phi}} = \frac{1200}{1 - 0,1} \approx 1333 \text{ л}$$

де  $E_{\phi}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{\text{роб.1}} = 1333$  л.

При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{\text{зап}} = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{\phi.1} = 1333 / 0,6 = 2221$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 2000$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{V_{\text{сф}}} = \frac{1333}{2000} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{псл}} = \frac{V_{\text{роб.1}}}{1 + X_{\phi}} = \frac{1333}{1 + 0,1} = 1212 \text{ л}$$

де  $X_{\phi}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 1333 - 1212 = 121 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 200 л

Для одержання 121 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = \frac{V_{\text{пм1}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{121}{1 - 0,1} = 134 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{\text{ін.}} = 134/0,6 = 223 \text{ л}$ .  
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{\text{сін}} = 200 \text{ л}$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{V_{\text{сін}}} = \frac{134}{200} = 0,67$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс2}} = \frac{V_{\text{роб.2}}}{1 + X_{\text{ін}}} = \frac{134}{1 + 0,1} = 122 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 134 - 122 = 12 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в інокуляторі 20 л

Для одержання 12 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = \frac{V_{\text{пм2}}}{1 - E_{\text{ін}}} = \frac{12}{1 - 0,1} = 13,3 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{ін.} = 13,3/0,6 = 22$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний інокулятор  $V_{сін} = 20$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.2} = \frac{V_{роб.3}}{V_{сін}} = \frac{13,3}{20} = 0,66$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс3} = \frac{V_{роб.3}}{1 + X_{ін}} = \frac{13,3}{1+0,1} = 12,1 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм3} = V_{роб.3} - V_{пс3} = 13,3 - 12,1 = 1,2 \text{ л}$$

Розрахунок кількості посівного матеріалу для вирощування культури в колбах на качалці

Для культивування 1,2 л посівного матеріалу обираємо качалочні колби об'ємом 750 мл з коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ . Тоді кількість колб:

$$N_{колб} = \frac{V_{пм3}}{V_{колб} \times K_{зк}} = \frac{1200}{750 \times 0,2} = 8 \text{ шт}$$

Для культивування посівного матеріалу в колбах на качалках слід передбачити 8 колб.

## **2.4. Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту мікробного синтезу**

### **2.4.1. Обґрунтування форми випуску препарату, обґрунтування вибору всіх додаткових складових у препараті**

Пробіотичні препарати розділяють на окремі групи за агрегатним станом та технологією їх виготовлення. За агрегатним станом пробіотики поділяють на сухі й рідкі. До сухих пробіотичних препаратів зараховують: таблетки, порошки, гранули та висушені культури мікроорганізмів. До рідких пробіотиків належать препарати у вигляді розчинів і суспензій, у яких мікроорганізми не були піддані ліофілізації [71].

Відомо, що термін зберігання сухих препаратів більш тривалий, ніж рідких, до того ж вони менш залежні від умов зовнішнього середовища і,

таким чином, не вимагають суворого дотримання критеріїв зберігання. Тому більшість підприємств, особливо зарубіжних, вважають доцільним виробляти саме сухі пробіотики, які є більш зручними у зберіганні, транспортуванні та реалізації.

Рідкі пробіотики зберігають всі свої цінні властивості і починають діяти відразу ж після потраплення в організм. Більшість дослідників вважають, що краще у складі пробіотиків застосовувати живі культури мікроорганізмів. Однак, це вимагає суворого дотримання умов придатності, а термін зберігання у зазначених препаратів коротший, ніж у ліофілізованих препаратів і складає не більше 3 місяців [72].

Зважаючи на вищеописані характеристики основних форм пробіотиків, слід розглянути суху форму випуску кінцевого продукту. Форма випуску має передбачати зручність застосування цільового пробіотика для тварин. Зокрема, пробіотик на основі *B. subtilis* natto, *B. licheniformis*, *B. cereus* запропоновано використовувати для птиці.

Найпоширенішим методом введення пробіотиків на птахофабриках є додавання їх у корм, у той час як існує багато інших методів, таких як зондування (вакцини або краплі), спреї, гранули, таблетки, капсули з оболонкою або саше з порошком. Окрім додавання пробіотиків у корм, виробники також обирають додавати пробіотичні суміші у воду [73].

Згідно інструкції до застосування референтного препарату Імунобактерин D [74], препарат підмішують в корм птиці за встановленою нормою застосування. Тому обираємо виготовлення пробіотика для ветеринарії у формі порошку, оскільки в такій формі препарат можна як додавати до корму, так і випоювати з водою.

Для забезпечення стабільності препарату при зберіганні до складу вводять допоміжні речовини.

Так, у статті [75] наведено дані щодо складу пробіотичного препарату «Біосевен». Біосевен – пробіотична кормова добавка, яка являє собою білого кольору порошкоподібний препарат із вмістом 5–7 % масової частки вологи.

Пробіотик містить ліофілізовану культуру молочнокислих бактерій; лікарська форма – порошок. Даний препарат містить сироватку молочну суху в якості наповнювача.

Інший препарат Пробіотик МАКС, порошок 1,5 г [76] містить в складі карбонат кальцію, карбонат магнію та сахарозу в якості допоміжних речовин.

Кальцію карбонат виконує функцію наповнювача [77], магнію карбонат забезпечує стабільність порошку [78], сахароза виступає в якості наповнювача та підсолоджувача [79].

Отже, до складу пробіотика на основі *B. subtilis* natto, *B. licheniformis*, *B. cereus* для ветеринарії запропоновано ввести карбонат кальцію в якості стабілізатора та сахарозу в ролі наповнювача.

#### **2.4.2. Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки пробіотика**

Найбільш часто використовуваними пакувальними матеріалами є скляна тара, пластикова тара, папір і картон, металева та алюмінієва фольга. Первинна упаковка безпосередньо контактує з продуктом, вторинна упаковка призначена для інформації та додаткового захисту, а третинна упаковка є груповою, призначена для зберігання та транспортування. Первинна упаковка продукту має належним чином захищати продукт від навколишнього середовища, водночас бути сумісною із продуктом [80].

Папір і картон є основою традиційних пакувальних матеріалів, мають широкий спектр застосування, їх випуск становить близько 45% від загальної вартості пакувальних матеріалів. Папір і картон повинні мати відповідну міцність, ударостійкість і зносостійкість; хорошу герметичність і легкість очищення; відмінну форму і згин, легкість використання різних способів обробки; процес пакування має бути автоматизованим. Такий матеріал повинен характеризуватись якістю друку, екологічністю, економічністю та невеликою масою, що сприяє зменшенню витрат на упаковку та транспортування. Також важливим аспектом є повторне використання та

переробка задля зменшення забруднення навколишнього середовища та збереження ресурсів.

У свою чергу, порошкоподібні продукти фасують в пакети з алюмофольги. Алюмофольга, ламінована папером, плівкою або пластиком, часто використовується як термозварювана мембрана, що герметично закриває контейнер. Під впливом локалізованого нагрівання шляхом електричної індукції на лініях фасування та пакування відбувається процес запаювання пакету з одночасною герметизацією вмісту. Мембрана з алюмінієвої фольги забезпечує чудові бар'єрні властивості, запобігаючи проникненню вологи чи газу та захищаючи цільовий продукт від негативного впливу навколишнього середовища [80].

Варто зазначити, що алюмофольга, як і папір та картон, піддається переробці та повторному використанню, що засвідчує екологічність використання такого пакувального матеріалу. Разом з тим, на відміну від паперу та картону, пакети з алюмінієвої фольги забезпечують герметичність вмісту, що позитивно впливає на зберігання фасованого продукту.

Тому як первинне пакування для мультиштамового пробіотика у формі порошку обираємо пакети з алюмінієвої фольги. Оскільки таке пакування як правило складається з кількох шарів (алюміній, плівка ПВХ, папір), то потреба у додатковому вторинному пакуванню відсутня.



### РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Сьогодні мікроорганізми широко застосовуються при виготовленні пробіотичних препаратів як для людини, так і для тварин, а також входять до складу мікробних заквасок, які використовують у харчовій промисловості та кормовиробництві. Практичне використання їх обумовлено високою антагоністичною активністю до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здатністю продукувати вітаміни та інші біологічно активні речовини, стимулювати імунну відповідь макроорганізму [81].

Наразі широкого практичного застосування набули бактерії роду *Bacillus*. Ці бактерії характеризуються більш вираженою і різноманітною антимікробною активністю за рахунок продукування ними антибіотичних речовин, з яких близько 200 на сьогодні вже вивчено. Аеробні бацили володіють високою ферментативною активністю (амілолітичною, ліполітичною, целюлозолітичною, протеолітичною), продукують амінокислоти, в тому числі незамінні, та вітаміни, здатні активізувати макрофаги та індукцію інтерферонів. На основі бактерій роду *Bacillus* розроблено низку пробіотичних препаратів, які застосовують для лікування та профілактики інфекційних хвороб шлунково-кишкового тракту, підвищення продуктивності молодняку сільськогосподарських тварин і птиці, корекції імунного й антиоксидантного статусу макроорганізму [81].

Слід розглянути детальніше основні стадії технологічного процесу отримання ветеринарного пробіотика.

#### Зберігання культури

У процесі виробництва пробіотиків, як й інших продуктів мікробного синтезу, критичним фактором є можлива мінливість виробничих штамів мікроорганізмів унаслідок багаторазових пересівів. З урахуванням цього під

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування етапів виділення та очистки цільового продукту мікробного синтезу	Ліг.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Соколов Д.О.					48	7
Перевір.		Грегірчак Н.М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

час зберігання музейних і робочих культур мікроорганізмів потрібно постійно контролювати стабільність штамів та їхню фізіологічну активність [82].

Отже, першим етапом отримання пробіотика є зберігання та відновлення життєздатності культур *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*.

За призначенням розрізняють поживні середовища: основні, спеціальні, елективні, селективні, середовища накопичення, диференціально-діагностичні, консервуючі. Основні (загального вжитку) середовища використовують для культивування більшості мікроорганізмів. Це прості поживні середовища: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), поживний желатин, пептонна вода [83].

Оскільки представники роду *Bacillus* добре ростуть на середовищі МПА, для зберігання культури обираємо дане середовище. Колекційні культури штамів *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* зберігають у пробірках з МПА при температурі 5°C, пересіви культур проводять щоквартально (раз на 3-4 місяці).

### **Отримання інокуляту**

Підготовка інокуляту у виробництві пробіотиків передбачає кілька етапів, першим з яких є одержання робочої культури мікроорганізму з музейної. Далі здійснюють кілька послідовних пересівів робочої культури на рідких поживних середовищах. Іноді для вирощування посівного матеріалу використовують різні поживні середовища. У деяких випадках підготовка інокуляту може охоплювати до шести стадій (генерацій культури) [82].

У сучасній літературі наявна стаття [61], що засвідчує використання середовища Luria–Bertani для одержання інокуляту культур *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*.

Середовище Лурія–Бертані (LB) є складним середовищем, яке сприяє структурній еволюції субпопуляцій, в основному містить триптон/пептон, дріжджовий екстракт і NaCl. Середовище LB не лише використовується в

біохімічних молекулярних експериментах для попереднього культивування штамів, щоб штами можна було розмножувати відповідно до вимог використання, але також використовується для культивування генно-інженерних мікроорганізмів. Наукові дослідження підтверджують використання середовища LB для оптимального росту багатьох мікроорганізмів, включаючи бактерії та гриби. Зокрема, середовище LB підходить і для культивування представників роду *Bacillus* [84].

Таким чином, штами *B. subtilis natto*, *B. licheniformis*, *B. cereus* інкубують в колбах на качалках у рідкому середовищі Luria–Bertani протягом 12 год при температурі 37°C.

### **Виробничий біосинтез**

Після отримання інокуляту проводять виробничий біосинтез біомаси для одержання пробіотика.

Виробничий біосинтез здійснюють в умовах глибинного періодичного культивування в реакторах, установлених у боксах. Реактори зазвичай оснащують мішалкою й паровою оболонкою. Основними факторами, що обмежують розвиток мікроорганізмів за таких умов, є вичерпання компонентів поживного середовища та накопичення токсичних продуктів метаболізму. Цьому можна запобігти, здійснюючи дробну подачу субстрату або використовуючи діалізні камери для вилучення небажаних метаболітів. Перспективним також є безперервне культивування. Проте нині такий спосіб культивування широко не застосовують у виробництві пробіотиків. Упродовж виробничого біосинтезу періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин (КУО/см<sup>3</sup>) [82].

У статті [61] описано, що для виробничого біосинтезу біомаси використовували середовище Luria–Bertani, тобто аналогічне як і для одержання інокуляту. Отже, у ферментер засівають культури другої генерації *B. subtilis natto*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, отримані зі стадії вирощування інокуляту, у співвідношенні 1:1:1 в рівних об'ємах у кількості 10% від загального об'єму середовища культивування. Процес культивування

проводять протягом 12 годин за температури 37 °С, періодично подають повітря для аерації.

### **Виділення біомаси**

Залежно від вимог до повноти відділення дисперсної фази і особливостей культуральної рідини для розділення використовують процеси фільтрації, центрифугування, сепарації, рідше флотації [85].

Під **фільтруванням** розуміють розділення твердої та рідкої фаз під час перепускання суспензії крізь пористу перегородку (фільтр). Сьогодні до методів фільтрування можна віднести і мембранні процеси відокремлення від дисперсійної фази не тільки твердих частинок, але й розчинених речовин з утворенням концентратів цих речовин і пермеатів. У виробництвах, де цільовим продуктом є один з метаболітів, розчинений у культуральній рідині, для відокремлення клітин біомаси найчастіше використовують фільтрування.

**Центрифугування** – це процес розділення рідких неоднорідних систем у полі дії відцентрових сил. У мікробіологічній промисловості центрифуги широко використовують для розділення суспензій на рідину й тверді фази, що містять мікроорганізми, ферменти, амінокислоти й інші продукти біосинтезу кристалічної або аморфної структур. Центрифуги використовують в таких випадках:

- коли осад погано фільтрується;
- коли треба одержати біомасу, вільну від допоміжних фільтрувальних матеріалів;
- коли процес вимагає безперервності в умовах високої стерильності.

Головна перевага процесу центрифугування – висока продуктивність і компактність обладнання [85].

Також виділяють процес **сепарації**. Один з найпоширеніших видів центрифуг, вживаних в мікробіологічній промисловості, є сепаратори. Сепаратори використовуються для наступних методів впливу на суспензії та емульсії: розділення; концентрування; очищення; освітлення. Сепаратори, зокрема використовують для послідовного відокремлення грубодисперсного

осаду з тонкодисперсних суспензій, тобто для виконання двох або більше операцій по переробці рідких сумішей. Істотним недоліком сепараторів є швидка забиваемість мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями та мертвими клітинами.

Такий спосіб концентрування суспензій і виділення біомаси як флотація застосовують переважно у виробництві кормових дріжджів. Він полягає в тому, що отриману на стадії біосинтезу культуральну рідину спінюють, і при цьому велика частина дріжджів концентрується в пінній фракції. Відокремлюючи піну від основної маси рідини, отримують напівпродукт із вмістом біомаси в 2-4 рази вищим, ніж у початковій культуральній рідині [85].

Таким чином, відділення цільової біомаси будемо проводити шляхом центрифугування культуральної рідини, отриманої після виробничого культивування.

### **Ресуспендування біомаси**

За відсутності захисних речовин бактеріальні клітини зазнають значних змін, що може супроводжуватися руйнуванням клітинних структур і втратою життєздатності. У промисловості найчастіше застосовують комбіновані захисні середовища, що містять сахарозу, лактозу, цитрат, глютамат натрію, знежирене молоко, сироватку з додаванням різних вуглеводів, багатоатомних спиртів та солей. Стійкість до сушіння можна підвищити спрямованою селекцією штамів мікроорганізмів. Біомасу стабілізують також нетрадиційними способам, наприклад, іммобілізацією клітин у гелі гідроксиду алюмінію та ацетилфталіцилцелюлози. Цей технологічний спосіб забезпечує високий ступінь життєздатності мікроорганізмів під час зберігання і дає змогу вилучати з технологічного процесу сублимацію, що значно скорочує енергетичні та економічні витрати [82].

Літературні дані повідомляють, що ефективними ліопротекторами можуть бути [86]:

- вуглеводневі сполуки – цукроза, лактоза, тригалоza, мальтоза, манноза, сорбіт, агар-агар;

- білкові компоненти – желатин, сухе знежирене молоко, пептон;

- солі – цитрат натрію, глутамат натрію, фосфатний буфер.

Також було відзначено, що найвищим рівнем захисту відзначаються комплексні захисні середовища, які містять компоненти, представлені речовинами різної хімічної будови – вуглеводи, білки та солі [86].

Отже, для захисту клітин мульштамового пробіотика для ветеринарії обираємо захисне середовище, що міститиме сахарозу, желатозу та молоко. Таке середовище містить вуглеводневу сполуку, білковий компонент та інші необхідні речовини, що містяться у складі молока.

### **Одержання висушеної біомаси**

Як правило, напівфабрикат у вигляді стабілізованої захисним середовищем біомаси заморожують за температури  $-40^{\circ}\text{C}$ . За цієї температури його витримують упродовж 18-24 год, після чого сублімаційно сушать. У разі розливу напівфабрикату в ампули їх розміщують у морозильних камерах під кутом  $75^{\circ}$ , флакони – вертикально [82].

Кінцевою формою пробіотика на основі *B. subtilis* natto, *B. licheniformis*, *B. cereus* є сухий порошок клітинної біомаси. Для висушування у технології пробіотиків використовують сублімаційне або ж ліофілізаційне висушування.

Сушіння сублімацією або ліофільне висушування – один з найефективніших способів зневоднення живої біомаси, бактерійних препаратів та інших термолабільних біологічних об'єктів. При  $0^{\circ}\text{C}$  колоїдна система матеріалів, у тому числі їх волога, замерзає і надалі відбувається процес сублімації, тобто випаровування твердого тіла без його розплавлення, тобто з твердого агрегатного стану вода переходить у пароподібний, проминувши рідку фазу. За такого способу сушіння молекулярна структура матеріалу зберігається майже без змін і висушений матеріал характеризується доброю дисперсністю і пористістю, тим часом як за звичайного сушіння відбувається значне зменшення об'єму матеріалу [85].

Тому основною перевагою використання ліофілізації для отримання пробіотика для ветеринарії є подовження життєздатності клітин [87] без шкідливого впливу на якісні та кількісні характеристики препарату.

Також сушіння біомаси у ліофілізаторах дозволяє провести попередню стадію заморожування [88], що скорочує витрати на закупівлю додаткового обладнання.

## РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Процес одержання ветеринарного пробіотика включає такі етапи [89]:

- 1) Зберігання та відновлення життєздатності культури
- 2) Виробничий біосинтез біомаси
- 3) Відокремлення біомаси
- 4) Ресуспендування біомаси
- 5) Заморожування біомаси
- 6) Ліофільне висушування

Вихідні дані:

- об'єм культуральної рідини з однієї ферментації -  $V_{кр} = 1200$  л;
- концентрація біомаси у КР  $C_{БМ} = 12,7$  г/л – АСБ,
- втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 20%:
- початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає  $1200 \text{ л} \times 12,7 \text{ г/л} = 15,24$  кг; кінцева кількість (з урахуванням 20% втрат) має становити 18,3 кг.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці 4.1.

					<b>НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ</b>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Соколов Д.О.				55	3	
Перевір.		Грегірчак Н.М.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			<b>Кафедра БТМ</b>			



Таблиця 4.1

## Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 20%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>Виробничий біосинтез біомаси</b>						
1	Виробниче культивування у ферментері	Культуральна рідина	1200	0,22 кг (60%)	1140 л	Збірник об'ємом 1500 л
		Біомаса	15,2 кг (1200×12,7)- АСБ, з урахуванням 78% вологості 131,7 кг	6,6 кг (5%)	125,1 кг	Збірник об'ємом 300 л
<b>Виділення та очищення біомаси</b>						
2	Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	-	-	125,1 кг	Центрифуга
		Фугат	1075 л (1200-125,1)	-	1075 л	На утилізацію

Закінчення таблиці 4.1

3	Ресуспендування біомаси	Біомаса	125,1 кг	-	-	Збірник 300 л
		Захисне середовище	125,1 кг	-	-	
		Ресуспендована біомаса	250,2 кг (125,1+125,1, при співвідношенні 1:1)	-	-	- (передається одразу на заморожування)
4	Заморожування біомаси	Ресуспендована біомаса	250,2 кг	-	-	Ліофілізаційна машина
		Заморожена біомаса	250,2 кг	12,5 кг (5%)	237,7 кг	- (одразу відбувається процес ліофілізації)
5	Ліофільне висушування	Заморожена біомаса	237,7 кг	-	-	Ліофілізаційна машина
		Висушена біомаса (вологість 6%)	-	-	18,3 кг	Ємність об'ємом 20 л

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

У таблиці 5.1 наведено специфікацію основного обладнання, зображеного на апаратурній схемі у графічній частині кваліфікаційної роботи.

Таблиця 5.1.

### Специфікація ділянки отримання пробіотичного препарату для ветеринарії

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Д-1	Дозатор	1	Дозатор для сипучих продуктів NPF-3000-201 Hualian. Обсяг бункера, л: 40. Принцип дозування: вібраційне падіння. Спосіб дозування: ваговий. Діапазон дозування: 10-3000 г. Похибка дози (допустима): до 2%. Компанія: «Hualian» (Китай) [90]
Ф-2	Індивідуальний фільтр	1	Фільтропалотно Петрянова ФПП-15-1,5. Компанія: «Сорбент» (Україна) [91]
ФР-3	Ферментер 2000 л	1	Ферментер об'ємом 2000 л. Матеріал AISI 304, є сорочка та ізоляція (мінеральна вата, пінополіуретан), D = 1500 мм, H = 2950 мм. Компанія: «Термо-Паб» (Україна) [92]
Н-4 Н-7	Насос	2	Насос 2CDX 70/15, 380V. Продуктивність 4,8 м <sup>3</sup> /год. Матеріал AISI 304. Компанія: «Ebara» (Італія) [93]
Ц-5	Центрифуга	1	HAUS DDE 2342 декантерна центрифуга для розділення осаду. Частота обертання 5400 об/хв. Максимальна продуктивність 5 м <sup>3</sup> /год. Компанія: «HAUS» (Туреччина) [94]
З-6	Збірник 300 л	1	Реактор 300 літрів. Матеріал - сталь нержавіюча 316 AISI. Частота обертів мішалки – 60 об/хв. Компанія: «Промвіт» (Україна) [95]
МР-8	Машина розливу	1	Машина розливу з пакуванням в лотки GALDI RG250 UCS. Продуктивність 5000 упаковок/год. Компанія: «Magiani» (Італія) [96]

НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Соколов Д.О.		
Перевір.		Грегірчак Н.М.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання				
		Літ.	Арк.	Аркушів
			58	2
Кафедра БТМ				

Закінчення таблиці 5.1

СС-9	Сублімаційна сушка	1	Сублімаційна сушка ліофілізатор LG-30, 300 кг. Компанія: «Укрторгхім» (Україна) [97]
З-10 З-13	Збірник 20 л	2	Вертикальний резервуар з нержавіючої сталі об'ємом 20 л. Внутрішній діаметр 265 мм х довжина 365 мм. Дно конічне з центральним випускним отвором. Верх оснащений кришкою з нержавіючої сталі. Компанія: «Perry Videx» (США) [98]
Д-11	Дробарка	1	Дробарка ДМБ-10 молоткова безрешетна. Технічна продуктивність 8-12 т/год. Діаметр ротора 608 мм. Встановлена кількість молотків 120 або 240 шт. Компанія: «HYDROLIDER» (Україна) [99]
ВС-12	Вібраційне сито	1	Вібропросівач ВП-800. Кількість сит – 1. Тип сітки 2,00-1,20 12Х18Н9 ГОСТ 3826-82. В комплекті з паспортом. Компанія: «Технік» (Україна) [100]

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Технологічна схема виділення та очищення біомаси *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* передбачає етапи зберігання культури, виробничий біосинтез, а також стадії виділення та отримання висушеної біомаси.

### *ТП 1. Зберігання та відновлення життєздатності культури*

#### *ТП 1.1. Зберігання культури*

Колекційні культури штамів *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* зберігають у пробірках зі скошеним м'ясо-пептонним агаром (МПА) при температурі 5°C, пересіви культур проводять щоквартально (раз на 3-4 місяці). При роботі з колекційними культурами дотримуються строго асептичних умов.

#### *ТП 1.2. Відновлення життєздатності культури*

Штами *B. subtilis* natto, *B. licheniformis*, *B. cereus* інкубують в колбах на качалках у рідкому середовищі Luria–Bertani протягом 12 год при температурі 37°C.

### *ТП 2. Виробничий біосинтез біомаси*

#### *ТП 2.1. Підготовка поживного середовища*

12 кг пептону, 6 кг дріжджового екстракту та 0,6 кг хлориду натрію завантажують через ваговий дозатор Д-1 у попередньо простерилізований ферментер ФР-3. Подають 1181 л питної води, вмикають перемішуючий пристрій. Стерилізують середовище протягом 30 хв за температури 120°C.

#### *ТП 2.2. Біосинтез*

У ферментер ФР-3 засівають культури другої генерації *B. subtilis* natto, *B. licheniformis*, *B. cereus* у співвідношенні 1:1:1 в рівних об'ємах у кількості

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення цільового продукту мікробного синтезу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Соколов Д.О.					60	3
Перевір.		Грегірчак Н.М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

10% від загального об'єму середовища культивування. Процес культивування проводять протягом 12 годин за температури 37 °С, повітря для аерації подають через індивідуальний фільтр Ф-2.

### *ТП 3. Виділення та очищення біомаси*

#### *ТП 3.1. Центрифугування культуральної рідини*

Після отримання максимальної кількості біомаси проводять відділення клітин від культуральної рідини за допомогою центрифугування. З ферментеру ФР-3 культуральну рідину насосом Н-4 перекачують до на центрифуги Ц-5 та проводять відділення клітин при 8000 об/хв протягом 20 хвилин.

#### *ТП 3.2. Ресуспендування біомаси*

Отриману очищену біомасу ресуспендують захисним середовищем, що містить, %: сахарозу – 50, желатозу – 25, молоко – 25. Ресуспендування біомаси у захисному середовищі проводять у збірнику З-6 у співвідношенні 1:1.

#### *ТП 3.3. Розлив суспензії у лотки*

Суспензію ресуспендованої біомаси насосом Н-7 передають до машини розливу МР-8 в лотки. Обсяг дозування - 1 л. Наповнені лотки вручну передають до сублімаційної сушки СС-9.

#### *ТП 3.4. Заморожування біомаси*

Суспензію ресуспендованої біомаси вручну передають до сублімаційної сушки СС-9 на попереднє заморожування. Заморожування проводять протягом 12 годин при температурі -20°С.

#### *ТП 3.5. Ліофільне висушування*

Процес ліофільного висушування проводять у сублімаційній сушці СС-9 при температурі 34°С та тиску 26 Па протягом 20 годин, n= 300 об/хв.

Отриману висушену біомасу переносять у збірник З-10.

#### *ТП 3.6. Подрібнення висушеної біомаси*

Висушена біомаса від ТП 3.5 надходить на дробарку Д-11 молоткового типу. Технічна продуктивність становить 8-12 т/год.

Подрібнену мікробну біомасу направляють на вібраційне сито ВС-12 для просіювання.

### *ТП 3.7. Просіювання подрібненої біомаси*

Подрібнену мікробну біомасу вручну вивантажують на вібраційне сито ВС-12. Матеріал завантажується на решітку, встановлену в кришці , далі матеріал потрапляє на сітку 2,00-1,20 12X18Н9 ГОСТ 3826-82 з діаметром отворів 2,00 мм. Під впливом вібрації та сили тяжіння матеріал просівається та потрапляє в зону вивантаження. Вивантаження здійснюється через патрубок діаметром 200 мм у збірник 3-13.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКТУ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

### 1. Опис

Порошок від білого до жовтого кольору.

### 2. Специфічна нешкідливість

При одноразовому прийомі всередину препарат повинен бути нешкідливим для білих мишей.

Дослідження здійснюють з використанням 5 безпородних мишей різної статі масою 14-16 г (масу тіла вимірюють безпосередньо перед початком випробування).

Вміст флакона розводять *водою Р* у кількості 0,5 мл на дозу препарату. Кожній з п'яти мишей вводять перорально в шлунок по 0,5 мл отриманої суспензії за допомогою шприц-насадки ємністю 1 мл. Термін спостереження - 5 днів.

Всі тварини повинні залишатися живими і не худнути.

Якщо за цей період хоча б одна тварина загине або втратить вагу, тест повторюють на подвійній кількості тварин. Якщо під час повторних випробувань жодна миша не загине, препарат вважається нешкідливим. В іншому випадку проводять бракування даної серії препарату.

### 3. Специфічна активність

Специфічну активність препарату встановлюють шляхом визначення кількості життєздатних дріжджових клітин в 1 дозі досліджуваного засобу.

1 доза препарату має містити не менше  $10^8$  живих клітин. Визначення кількості життєздатних бактерій в разовій дозі препарату проводять на трьох пробах препарату з кожної серії.

Кількість життєздатних бактерій у дозі препарату встановлюють у паралелі з робочим стандартним зразком (РСЗ).

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Соколов Д.О.			РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва продукту мікробного синтезу	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					63	6
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



РСЗ препарату являє собою висушену завись біомаси *Bacillus subtilis* natto, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, що містить  $10^8$  живих мікробних клітин в одній дозі. Зберігати при температурі  $-(18\pm 2)$  °С.

Субстанцію, що міститься у флаконах досліджуваного зразка та РСЗ розбавляють водою *P* в пропорції 1 мл на 1 дозу та залишають на 1 год при кімнатній температурі з метою регідратації субстанції біомаси. Одержані мікробні зависі по 1 мл переносять у пробірки з 9 мл модифікованого печінкового середовища Блаурока, після чого перемішують 12–15 кратним прокачуванням. Так одержують 1 дозу бактерій в обсязі 10 мл середовища (що відповідає розведенню  $10^{-1}$ ). З даних пробірок готують послідовні десятикратні розведення до концентрації  $10^{-10}$ . Пробірки з досліджуваними розведеннями у відповідних поживних середовищах поміщають в термостат за температури  $38\pm 1$  °С та витримують чотири доби.

По завершенню інкубування фіксують розведення, для яких спостерігається видимий ріст колоній *Bacillus* у формі прямих паличок з заокругленими або “обрубленими” кінцями.

Кількість живих бактерій *N* в одній дозі встановлюють за формулою:

$$N = n \times 10^{m-1}$$

де *n* – кількість колоній в одній пробірці;

*m* – величина розведення мікробної суспензії.

Перш за все, враховують результат в ряду розтитровування РСЗ. Якщо ріст бактерій фіксують в розведенні не менше  $10^{-10}$ , це означає, що ростові властивості поживного середовища є задовільними, а результати достовірними. Якщо в ряду розведень РСЗ наявний ріст у розведенні меншому за  $10^{-10}$ , дослід потребує повторного проведення з використанням іншої серії поживного середовища.

Препарат є придатним, якщо в одній дозі кількість живих клітин складає не менше  $10^8$  КУО.

#### 4. Мікробіологічна чистота

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та дріжджеподібних грибів.

Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42 [101].

Зразок масою 10 г вміщують у мірний флакон на 250 мл, доводять до 100 мл при розведенні 1:10 за допомогою буферного розчину з NaCl та пептоном, при рН 7,0, перемішуючи до утворення однорідної суспензії.

Для встановлення загального числа бактерій по 1 мл суспензії висівають не менш, ніж на 2 чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 способом двошарового висіву.

Для визначення загального числа грибів по 1 мл суспензії висівають не менш, ніж на 2 чашки Петрі з густим поживним середовищем 2 способом двошарового висіву.

Посіви на середовищі №1 витримують при 30–35 °С для виявлення бактерій, у той час як посіви з середовищем №2 вирощують при 20–25 °С для виявлення грибів упродовж 5 діб, у випадку відсутності результатів раніше.

Для визначення певних видів мікроорганізмів здійснюють висів по 10 мл суспензії на наступних рідких поживних середовищах: №3 (бактерії родини *Enterobacteriaceae*) та №8 (*Pseudomonas aureginosa* і *Staphylococcus aureus*). Посіви пророщують при 30–35 °С упродовж 18–24 год, потім здійснюють пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5; у свою чергу, пересівають з середовища №8 на середовища №9 та №10 відповідно. Посіви витримують при 35–37 °С близько 24–48 год. При спостережанні росту мікроорганізмів здійснюють їх ідентифікацію за нормами ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с.42.

Препарат не має містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджів. При виявленні у наявних посівах сторонніх мікроорганізмів, здійснюють контроль на удвічі більшій кількості зразків. За відсутності росту мікроорганізмів при повторних висівах вважають, що досліджуваний засіб

відповідає нормам. Якщо при повторному висіві наявний ріст сторонніх мікроорганізмів, то дану серію позначають як брак [101].

Нижче наведено пропис поживних середовищ, що використовуються у дослідженнях.

**Модифіковане печінкове середовище Блаурока:**

Печінка великої рогатої худоби (ГОСТ 193421–73)

(печінковий відвар (1 : 2)) – 1 л

Агар мікробіологічний (ГОСТ 17206–96) – 0,025 кг

Лактоза (ДФУ, 1 вид, Доп. 2, 2008, с.485) – 0,01 кг

Натрію хлорид (ДФУ, 1 вид, Доп. 1, 2004, с.422) – 0,005 кг

Пептон сухий для бактеріологічних цілей

(ГОСТ 13805-76) – 0,01 кг

Цистеїн (ДФУ, 1 вид, 2004, с.483) – 0,0001 кг

**Сухе біфідум-середовище Блаурока:**

Агар мікробіологічний (ГОСТ 17206–96) – 0,75 г

Панкреатичний гідролізат казеїну (ТУ 9385-002-00479327–98) – 30,0 г

Екстракт пекарських дріжджів (ТУ 9385-18-00479327–2000) – 5,0 г

Глюкоза (ДФУ, 1 вид, Доп. 2, 2008, с. 417) – 7,5 г

Лактоза (ДФУ, 1 вид, Доп. 2, 2008, с.483-485) – 2,5 г

Цистеїн (ДФУ, 1 вид, 2004, с.483) – 0,5 г

Натрію хлорид (ДФУ, 1 вид, Доп. 1, 2004, с.422) – 2,5 г

Магній сірчаноокислий 7-водний (ГОСТ4523–77) – 0,5 г

Кислота аскорбінова (ДФУ, 1 вид, 2004, с.483) – 0,5 г

Натрій оцтовокислий (ГОСТ 199–78) – 0,3 г

Вода очищена – до 1 л

pH (6,0±0,3)

**Середовище МРС-5:**

Агар мікробіологічний (ГОСТ 17206–96) – 20,0 г

Магній сірчаноокислий 5-водний (ГОСТ435–77) – 0,05 г

Цистеїн (ДФУ, 1 вид, 2004, с.483) – 0,1 г

Магній сірчаноокислий 7-водний (ГОСТ4523–77) – 0,2 г

Калій фосфорнокислий двозаміщений 3-водний (ГОСТ 2493–75) – 2,0 г

\* Печінковий екстракт – 100,0 мл

\*\* Дріжджовий автолізат з вмістом амінного азоту (0,15±0,03) % – 50,0мл

Пептон сухий для бактеріологічних цілей (ГОСТ 13805–76) – 10,0 г

\*\*\* Гідролізат знежиреного молока – 330,0 мл

Твін-80 (Eph, вид 4 [0428]) – 1,0 мл

Глюкоза (ДФУ, 1 вид, Доп. 2, 2008, с. 417) – 20,0 г

Вода очищена – до 1 л

pH (6,4±0,2)

\* Печінковий екстракт з вмістом амінного азоту (0,050±0,005) %

1. Печінка великої рогатої худоби (ГОСТ 193421–73) – 0,5 кг

2. Вода очищена – 1,0 л

\*\* Дріжджовий автолізат з вмістом амінного азоту (0,15±0,03) %

1. Дріжджі хлібопекарські (ГСТ 171–81) – 2,5 кг

2. Вода питна – 10,0 л

3. Хлороформ (Vph, 2005, ГОСТ 20015–88) – 0,1 л

\*\*\* Гідролізат знежиреного молока

1. Молоко коров'яче пастеризоване, знежирене

(ДСТУ 2661–94) – 1,0 л

2. Натрію гідроксид

(ДФУ, 1 вид, Доп. 1, 2004, с.411) 20% розчин – до pH (8,0±0,2)

3. Панкреатин (ТУ 49–619–79) – 1,0 г

4. Хлороформ (Vph, 2005, ГОСТ 20015–88) – 10,0 мл

Аміний азот – (0,18±0,02) %, пептиди – (2,6±0,2) %

Натрію хлорид – (0,25±0,05) %, триптофан – (32,0±2,0) мг%

**Казеїново-дріжджове середовище (КД-5):**

Нативний дріжджовий автолізат із дріжджів (150 мг%) – 650 мл

Триптичний гідролізат казеїну з вмістом амінного азоту 150 мг% –  
350мл

Лактоза (ДФУ, 1 вид, Доп. 2, 2008, с.483–485) – 10 г

Натрію хлорид (ДФУ, 1 вид, Доп. 1, 2004, с.422) – 5 г

Цистеїн (ДФУ, 1 вид, 2004, с.483) – 0,1 г

Агар мікробіологічний (ГОСТ 17206–96) – 0,75 г

pH середовища (7,2±0,2)

**Голодний агар:**

1. Агар мікробіологічний (ГОСТ 17206–96) – 13,0 г

2. Вода очищена – 1,0 л

## РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ (ТУ) НА ВИПУСК ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 8.1. Основна характеристика мультиштамового пробіотику для ветеринарії

Склад: вміст *Bacillus subtilis natto*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* –  $1 \times 10^8$  КУО/г; допоміжні речовини – карбонат кальцію, сахароза до 1 г.

Лікарська форма: порошок.

Форма випуску: пакети з алюмінієвої фольги (1 г, 5 г, 200 г, 500 г, 1 кг, 5 кг).

Фармакологічні властивості: пробіотик пригнічує ріст патогенних та токсигенних грибів у кормах, сприяє створенню сприятливих умов для травлення, покращує споживання та перетворення корму, зменшує вплив токсичних речовин на організм тварин, проявляє зміцнюючу дію щодо імунітету, покращує продуктивність тварин та збереженість поголів'я молодняку. Препарат нормалізує мікрофлору кишечника внаслідок колонізації кишкового епітелію, виявляє антагоністичну активність щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. За рахунок зменшення патогенів у кишечнику відмічають збільшення чисельності ендогенних лактобактерій. Бактерії роду *Bacillus* сприяють більш повному перетравленню та покращенню конверсії корму. Підвищує несучість у курей-несучок, продуктивність бройлерів та свиней.

Застосування: для зміцнення імунітету і нормалізації мікрофлори кишечника, підвищення збереженості та продуктивності поголів'я, покращення конверсії корму.

Дозування: змішують з кормом чи водою з наступного розрахунку.

					НУХТ БТЕК 02.01.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Соколов Д.О.			РОЗДІЛ 8. Проект технічних умов (ТУ) на випуск товарної форми цільового продукту	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Грегірчак Н.М.					69	8
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

## Розрахунок дози пробіотика для тварин

<b>Птиця</b>	
0,2 – 0,4 кг на тонну корму чи комбікорму	
Бройлери віком до 15 днів	0,1 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
Бройлери віком від 15 днів і до забою	0,2 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
Кури-несучки	0,2 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
Індики	0,1-0,3 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
<b>Свині</b>	
0,2 – 0,4 кг на тонну корму чи комбікорму	
Свиноматки	5 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
Поросята	1 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
Свині на відгодівлі	3 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
<b>ВРХ (телята)</b>	
Профілактика	2 г/гол. 3 рази: I - з першою порцією молозива, II і III - при наступних випоюваннях
Лікування	2 г/гол. з питною водою 2 рази на день 3 дні підряд
Стимуляція росту	5 г/гол на добу з питною водою чи з кормом 7 діб підряд з наступним інтервалом 7 діб протягом терміну відгодівлі
<b>Кролі</b>	
0,2 – 0,4 кг на тонну комбікорму/ тонну води, або з розрахунку 0,2 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом	
<b>Коти, собаки, хутрові звірі</b>	
Коти, собаки дрібних порід, цуценята	0,5 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
Собаки середнього розміру, хутрові звірі	1 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом
Собаки крупних порід	2 г/гол. на добу з питною водою чи з кормом

Протипоказання: відсутні.

Зберігання: у сухому, темному, недоступному для дітей місці при температурі від 0 до 40°C. Термін придатності - 24 місяці.

## 8.2. Показники якості пробіотика для ветеринарії

### 1. Опис

Порошок від білого до жовтого кольору.

### 2. Автентичність

*Bacillus subtilis* – це грампозитивні спороутворювальні палички із закругленими кінцями, рухливі, на агаризованому картопляно-мінеральному середовищі при температурі 37 °С через 18-20 годин утворюють слизисті, блискучі колонії, підвищені, округлої форми, діаметром 1,0-3,0 мм, а на 24-48 годину культивування – складчасті, матові, з підвищеним центром і зазубреними краями, безбарвні чи білуватого кольору [81].

*Bacillus licheniformis* — це грампозитивна бактерія паличкоподібної форми, яка є близькоспорідненою до *B. subtilis*. Мінімальна температура для росту коливається між 15–20 °С, вид має здатність рости за температури до 55–57°С, а оптимальна температура росту становить 48–50°С [102].

Ці бактерії являють собою великі рухливі палички розміром 0,6-0,8 x 1,5-3,0 мкм, розміщуються ланцюжками. Колонії круглі, неправильної форми, білуваті, середнього розміру (2-6 мм в діаметрі). Відсутність гемолізу на кров'яному агарі. Може утворювати спори [103].

*Bacillus cereus* є каталазопозитивною, факультативно анаеробною, спороутворюючою грампозитивною бацилою. При фарбуванні за Грамом у крові та шоколадному агарі *B. cereus* має рівномірний бацилярний вигляд. Їх розмір коливається від 3 x 0,4 мкм до 9 x 2 мкм. Колонії *B. cereus* мають неправильний периметр? непрозорі на агарі з овечою кров'ю. При вирощуванні на яечно-жовтковому агарі спостерігається зона помутніння внаслідок продукції лецитинази. Спори можуть бути наявні або відсутні [104].

### 3. Розчинність

При розчиненні препарату у воді Р з розрахунку 1 мл води на 1 дозу препарату при ретельному перемішуванні протягом 5 хв утвориться суміш жовтуватого кольору. Визначення проводять візуально [101].



#### 4. Прозорість

Суміш має бути не прозорою. Розчин готують за п.3 «Розчинність». Визначають візуально.

#### 5. Втрата в масі при висушуванні

Не більше 3.5 %. Визначають за методикою ДФУ, 2.2.32 [101].

0,1 г сухої розтертої в порошок біомаси із пакета висушують у вакуум-сушильній шафі при температурі від 58 °С до 62 °С і за тиску від 1,5 кПа до 2.5 кПа до постійної маси.

#### 6. Специфічна нешкідливість

При одноразовому прийомі всередину препарат повинен бути нешкідливим для білих мишей.

Дослідження здійснюють з використанням 5 безпородних мишей різної статі масою 14-16 г (масу тіла вимірюють безпосередньо перед початком випробування).

Вміст флакона розводять *водою P* у кількості 0,5 мл на дозу препарату. Кожній з п'яти мишей вводять перорально в шлунок по 0,5 мл отриманої суспензії за допомогою шприц-насадки ємністю 1 мл. Термін спостереження - 5 днів.

Всі тварини повинні залишатися живими і не худнути.

Якщо за цей період хоча б одна тварина загине або втратить вагу, тест повторюють на подвійній кількості тварин. Якщо під час повторних випробувань жодна миша не загине, препарат вважається нешкідливим. В іншому випадку проводять бракування даної серії препарату.

#### 7. Специфічна активність

##### *Антагоністична активність*

Антимікробну дію досліджуваних пробіотичних культур визначають кількома методами, наприклад відстроченого антагонізму, різновидом якого є метод агарових блоків. Штами пробіотичних мікроорганізмів засівають «газоном» у товщі агаризованого середовища МРС. Для цього 1 см<sup>3</sup> мікробної суспензії переносять у стерильну чашку Петрі, вносять 15-20 см<sup>3</sup>

розплавленого агаризованого середовища, охолодженого до температури  $(45\pm 1)$  °С, ретельно перемішують і залишають чашки на холодній горизонтальній поверхні до затвердіння середовища [82].

Вирощування здійснюють в анаеробних умовах за температури 37 °С упродовж 72 год, після чого агаровий блок вирізають пробійником та розміщують у центрі чашки Петрі з середовищем Гаузе-2 (або будь-яким іншим, придатним для вирощування досліджуваних патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів) і радіально підсівають тест-культури. Засіяні чашки інкубують за температури 37 °С упродовж 72 год. Ступінь чутливості тест-культур оцінюють за розмірами зон затримки росту, мм: 5-15 - малочутливі ; 15-20 - помірно чутливі ; 20-30 – чутливі; 30-40 – високочутливі.

#### *Адгезивна активність*

Адгезивну активність визначають за допомогою різних методів: мікробіологічних, світлової та електронної мікроскопії, біофізичних і математичних. Експрес-метод призначений для швидкого та одночасного визначення адгезивних властивостей великої кількості штамів мікроорганізмів. Для цього використовують 1 М фосфатний буфер в ізотонічному розчині хлориду натрію (рН 7,2-7,3). Мікроорганізми вирощують у рідкому середовищі МРС упродовж 2 діб за температури 37 °С. Субстратом є формалінізовані еритроцити людини, попередньо двічі відмиті буферним розчином з центрифугуванням (300-1000 об/хв). Використовують суспензію еритроцитів концентрацією  $10^8$  кл/см<sup>3</sup> буфера. Для проведення досліду на предметне скельце наносять одну краплину буферного розчину, в якому суспендують по одній краплині (посівною петлею) суспензії еритроцитів та мікроорганізмів безпосередньо з поживного середовища. На одному предметному скельці можна одночасно помістити до п'яти зразків . Предметне скельце з еритроцитами та мікроорганізмами поміщають у вологу камеру (чашку Петрі) на 30 хв за температури 37 °С. Потім препарат сушать

за тієї самої температури, фіксують жаром та фарбують метиленовим синім або фуксином.

Підрахунок ведуть на 50 еритроцитах, переглядаючи все предметне скельце. Штами із значенням ІАМ:  $\leq 1,75$  належать до неадгезивних, 1,76-2,5 - низькоадгезивних, 2,51-4,0 - середньоадгезивних,  $\geq 4,0$  - високоадгезивних.

#### *Імуномодулювальна активність*

Імуномодулювальні властивості пробіотичних організмів досліджують, аналізуючи їхній вплив на продукцію цитокінів. Для цього білим безпородним лабораторним мишам масою 16-18 г упродовж 5 діб з інтервалом у 24 год вводять перорально по 0,5 та 1,0 см<sup>3</sup> суспензії пробіотика у фізіологічному розчині. Контрольній групі мишей вводять перорально по 0,5 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину. Досліджують також вплив одноразового перорального введення пробіотиків тваринам на індукцію імунорегуляторних цитокінів. Концентрації препаратів для тварин перераховують відповідно до маси тіла дослідних тварин або маси мозку.

Мишей забивають методом цервікальної дислокації та одержують сироватку крові тварин, селезінку, спленоцити та макрофаги перитонеального ексудату (МФПЕ). Спленоцити у концентрації 10<sup>6</sup> кл/см<sup>3</sup> отримують із селезінки тварин. Життєздатність клітин визначають у тесті з трипановим синім (має бути не менш як 95 %) [82].

#### **8. Мікробіологічна чистота**

Препарат не повинен містити сторонніх мікроорганізмів, пліснявих та дріжджеподібних грибів.

Визначають згідно з ДФУ, доп. 1, р. 2.6.12, с.37, р. 2.6.13, N, с. 42 [101].

Зразок масою 10 г вміщують у мірний флакон на 250 мл, доводять до 100 мл при розведенні 1:10 за допомогою буферного розчину з NaCl та пептоном, при рН 7,0, перемішуючи до утворення однорідної суспензії.

Для встановлення загального числа бактерій по 1 мл суспензії висівають не менш, ніж на 2 чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 способом двошарового висіву.

Для визначення загального числа грибів по 1 мл суспензії висівають не менш, ніж на 2 чашки Петрі з густим поживним середовищем 2 способом двошарового висіву.

Посіви на середовищі №1 витримують при 30–35 °С для виявлення бактерій, у той час як посіви з середовищем №2 вирощують при 20–25 °С для виявлення грибів упродовж 5 діб, у випадку відсутності результатів раніше.

Для визначення певних видів мікроорганізмів здійснюють висів по 10 мл суспензії на наступних рідких поживних середовищах: №3 (бактерії родини *Enterobacteriaceae*) та №8 (*Pseudomonas aureginosa* і *Staphylococcus aureus*). Посіви пророщують при 30–35 °С упродовж 18–24 год, потім здійснюють пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5; у свою чергу, пересівають з середовища №8 на середовища №9 та №10 відповідно. Посіви витримують при 35–37 °С близько 24–48 год. При спостережанні росту мікроорганізмів здійснюють їх ідентифікацію за нормами ДФУ, доп. 1, р. 2.6.13, N, с.42.

Препарат не має містити сторонніх мікроорганізмів, плісняви та дріжджів. При виявленні у наявних посівах сторонніх мікроорганізмів, здійснюють контроль на удвічі більшій кількості зразків. За відсутності росту мікроорганізмів при повторних висівах вважають, що досліджуваний засіб відповідає нормам. Якщо при повторному висіві наявний ріст сторонніх мікроорганізмів, то дану серію позначають як брак [101].

## 9. Пакування

Упаковка повинна бути єдиною для кожної серії, що упаковуються. Групова тара з має бути склеєна або обв'язана. Групова та транспортна тара пакуються відповідно до ГОСТ17768–90. На первинну упаковку наклеюють етикетку з етикеткового паперу за ГОСТ 7625-86 або паперу для письма за ГОСТ 18510-87, або етикетку на липкій основі.

## **10. Маркування**

Кожна одиниця споживчої тари має бути забезпечена етикеткою, листком-вкладишем або інструкцією із застосування. У групову тару вкладають інструкції щодо застосування у кількості, передбаченій нормативно-технічною документацією.

На пачці та етикетці групової тари українською мовою вказується: країна, виробник, товарний знак та адреса, назва препарату латинською, англійською, українською мовами, лікарська форма, кількість доз, кількість продукту, «Для застосування перорально», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер в країні імпортері, якщо є необхідність. На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок. Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192–96.

## **11. Транспортування**

Препарат транспортують у закритих транспортних засобах усіма видами критого транспорту за температури 2 – 8 °С.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глущенко А., Андрійчук А., Рубленко І., Зоценко В., Островський Д., Тарануха С. Аналіз принципів застосування про-та пребіотиків у тваринництві. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти «Молодь – аграрній науці і виробництву»*. 2022, 32.
2. Шелест Б. Ефективність використання пробіотичних препаратів у тваринництві. *Збірник студентських наукових праць «Сільськогосподарські науки»*. 2022, 3 (7), 390.
3. Ahmadzadeh A., Nobakht A., Mehmannaavaz Y. Supplementary prebiotics, probiotics, and thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil for broilers: performance, intestinal morphology, and fecal nutrient composition. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2022, 1-9. doi: 10.1007/s12602-022-09927-3.
4. Вовк, С.О., Дмитроца, А.І., Польовий, І.В., Бучинський, В.М. (2021). Пробіотики у годівлі тварин і птиці. Передгірне та гірське землеробство і тваринництво, 69,157–168.
5. Коцюмбас, І. Я., Жила, М. І., Шкіль, М. І. (2013). Пробіотики — необхідна складова при сучасних технологіях вирощування тварин. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького, 15, 3, 2, 174-181.
6. Калініченко, С. В., Коротких, О. О., Тіщенко, І. Ю. (2016). Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків. Український біофармацевтичний журнал, 1, 4-10.
7. Бербенець, О. В., Гогітідзе, Н.А. (2009). Використання пробіотиків в тваринництві та птахівництві. Птахівництво,64, 135-140.
8. Iegorov, V., Kananykhina, O., Turpurova, T. (2021). Probiotic feed additives in fattening of agricultural animals. *Grain Products and Mixed Fodder's*. 21, 4, 25-31.
9. Параняк, Р. П., Калин, Б. М., Нагірняк,Т. Б. (2018). Значення та доцільність застосування пробіотиків. Науковий вісник Львівського

національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія : Ветеринарні науки, 20, 87, 116-121.

10. Anee, I.J., Alam, S., Begum, R.A. et al. (2021). The role of probiotics on animal health and nutrition. *JoBAZ*, 82, 52. <https://doi.org/10.1186/s41936-021-00250-x>.

11. Kuebutornye, F. K. A., Abarike, E. D., Lu, Y., Hlordzi, V., Sakyi, M. E., Afriyie, G., Wang, Z., Li, Y., & Xie, C. X. (2020). Mechanisms and the role of probiotic *Bacillus* in mitigating fish pathogens in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*.

12. Markowiak, P., Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog*, 10, 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>.

13. Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Qattan, S. Y. A., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Abdel-Moneim, A. M. E., & Alagawany, M. (2020). Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (berlin)*, 104, 1835–1850. <https://doi.org/10.1111/jpn.13454>.

14. Глущенко, А., Андрійчук, А., Рубленко, І., Зоценко, В., Островський, Д., Тарануха, С. (2022). Аналіз принципів застосування про-та пребіотиків у тваринництві. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти «Молодь – аграрній науці і виробництву», 32.

15. Шелест, Б. (2022). Ефективність використання пробіотичних препаратів у тваринництві. Збірник студентських наукових праць «Сільськогосподарські науки», 3, 7, 390.

16. Ahmadzadeh, A., Nobakht, A., & Mehmannaavaz, Y. (2022). Supplementary Prebiotics, Probiotics, and Thyme (*Thymus vulgaris*) Essential Oil for Broilers: Performance, Intestinal Morphology, and Fecal Nutrient Composition. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10.1007/s12602-022-09927-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09927-3>.

17. Alonso, S., Carmen Castro, M., Berdasco, M., de la Banda, I. G., Moreno-Ventas, X., & de Rojas, A. H. (2019). Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 569–579. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9439-2>.
18. Ahire, J. J., Mokashe, N. U., & Chaudhari, B. L. (2019). Effect of Dietary Probiotic *Lactobacillus helveticus* on Growth Performance, Antioxidant Levels, and Absorption of Essential Trace Elements in Goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 559–568. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9428-5>.
19. Standen, B. T., Peggs, D. L., Rawling, M. D., Foey, A., Davies, S. J., Santos, G. A., & Merrifield, D. L. (2016). Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 49, 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.037>.
20. Yeh, S.P., Chiu, C.H., Shiu, Y.L., Huang, Z.L., Liu, C.H. (2014). Effects of diets supplemented with either individual or combined probiotics, *Bacillus subtilis* E20 and *Lactobacillus plantarum* 7- 40, on the immune response and disease resistance of the mud crab, *Scylla paramamosain* (Estampador). *Aquaculture research*, 45,7, 1164-1175. doi: 10.1111/are.12061.
21. Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN microbiology*, 2012, 916845. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>.
22. Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 9, 2429. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429>.
23. Abd El-Tawab, M. M., Youssef, I. M., Bakr, H. A., Fthenakis, G. C., & Giadinis, N. D. (2016). Role of probiotics in nutrition and health of small



ruminants. *Polish journal of veterinary sciences*, 19(4), 893–906. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0114>.

24. Adetoye, A., Pinloche, E., Adeniyi, B. A., & Ayeni, F. A. (2018). Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. *BMC microbiology*, 18(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1248-y>.

25. Signorini, M. L., Soto, L. P., Zbrun, M. V., Sequeira, G. J., Rosmini, M. R., & Frizzo, L. S. (2012). Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Research in veterinary science*, 93(1), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.001>.

26. Renaud, D. L., Kelton, D. F., Weese, J. S., Noble, C., & Duffield, T. F. (2019). Evaluation of a multispecies probiotic as a supportive treatment for diarrhea in dairy calves: A randomized clinical trial. *Journal of dairy science*, 102(5), 4498–4505. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15793>.

27. Deng, Q., Odhiambo, J. F., Farooq, U., Lam, T., Dunn, S. M., & Ametaj, B. N. (2016). Intravaginal probiotics modulated metabolic status and improved milk production and composition of transition dairy cows. *Journal of animal science*, 94(2), 760–770. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9650>.

28. Olchoway, T.W.J., Soust, M., Alawneh, J. (2019). The effect of a commercial probiotic product on the milk quality of dairy cows. *J. Dairy Sci*, 102,3, 2188-2195. doi: 10.3168/jds.2018-15411.

29. Nalla, K., Manda, N. K., Dhillon, H. S., Kanade, S. R., Rokana, N., Hess, M., & Puniya, A. K. (2022). Impact of Probiotics on Dairy Production Efficiency. *Frontiers in microbiology*, 13, 805963. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.805963>.

30. Várhidi, Z., Máté, M., & Ózsvári, L. (2022). The use of probiotics in nutrition and herd health management in large Hungarian dairy cattle farms. *Frontiers in veterinary science*, 9, 957935. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.957935>.

31. Lan, R. X., Lee, S. I., & Kim, I. H. (2016). Effects of multistrain probiotics on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and noxious gas emission in weaning pigs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 100(6), 1130–1138. <https://doi.org/10.1111/jpn.12501>.
32. Piyadeatsoontorn, S., Taharnklaew, R., Upathanpreecha, T., & Sornplang, P. (2019). Encapsulating Viability of Multi-strain Lactobacilli as Potential Probiotic in Pigs. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 438–446. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9418-7>.
33. Sonia, T.A., Ji H., Hong-Seok, M., Chul-Ju, Y. (2014). Evaluation of Lactobacillus and Bacillus-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *African Journal of Microbiology Research*, 8,1, 96-104. doi: 10.5897/AJMR2013.6355.
34. Brousseau, J. P., Talbot, G., Beaudoin, F., Lauzon, K., Roy, D., & Lessard, M. (2015). Effects of probiotics *Pediococcus acidilactici* strain MA18/5M and *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* strain SB-CNCM I-1079 on fecal and intestinal microbiota of nursing and weanling piglets. *Journal of animal science*, 93(11), 5313–5326. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9190>.
35. Laskowska, E., Jarosz, Ł., & Grądzki, Z. (2019). Effect of Multi-Microbial Probiotic Formulation Bokashi on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Profile in the Serum, Colostrum and Milk of Sows, and in a Culture of Polymorphonuclear Cells Isolated from Colostrum. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(1), 220–232. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9380-9>.
36. Liao, S. F., & Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)*, 3(4), 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.007>.
37. Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, F., Mao, Y., Zhang, Y., Zeng, H., Ren, S., Guo, L., Chen, Z., Hrabchenko, N., Wu, J., & Yu, J. (2023). Mechanisms and applications of probiotics in prevention and treatment of swine diseases. *Porcine health management*, 9(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00295-6>.

38. Shah, M., Zaneb, H., Masood, S., Khan, R. U., Ashraf, S., Sikandar, A., Rehman, H. F. U., & Rehman, H. U. (2019). Effect of Dietary Supplementation of Zinc and Multi-Microbe Probiotic on Growth Traits and Alteration of Intestinal Architecture in Broiler. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(3), 931–937. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9424-9>.
39. Neveling, D. P., & Dicks, L. M. T. (2021). Probiotics: an Antibiotic Replacement Strategy for Healthy Broilers and Productive Rearing. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09640-z>.
40. Zhang, Z. F., & Kim, I. H. (2014). Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry science*, 93(2), 364–370. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03314>.
41. Yang, C. M., Cao, G. T., Ferket, P. R., Liu, T. T., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Chen, A. G. (2012). Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry science*, 91(9), 2121–2129. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02131>.
42. Ahmed, S. T., Mun, H. S., Islam, M. M., Kim, S. S., Hwang, J. A., Kim, Y. J., & Yang, C. J. (2014). Effects of Citrus junos by-products fermented with multistrain probiotics on growth performance, immunity, caecal microbiology and meat oxidative stability in broilers. *British poultry science*, 55(4), 540–547. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.938021>.
43. Kazemi, S. A., Ahmadi, H., & Karimi Torshizi, M. A. (2019). Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 103(5), 1399–1407. <https://doi.org/10.1111/jpn.13124>.
44. Gadde, U., Oh, S. T., Lee, Y. S., Davis, E., Zimmerman, N., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2017). The Effects of Direct-fed Microbial Supplementation, as an Alternative to Antibiotics, on Growth Performance, Intestinal Immune Status,

and Epithelial Barrier Gene Expression in Broiler Chickens. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 9(4), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9275-9>.

45. Redweik, G. A. J., Stromberg, Z. R., Van Goor, A., & Mellata, M. (2020). Protection against avian pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Kentucky exhibited in chickens given both probiotics and live *Salmonella* vaccine. *Poultry science*, 99(2), 752–762. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.038>.

46. Araujo, R.G., Polycarpo, G.V., Barbieri, A., Silva, K.M., Ventura, G., Polycarpo, V. C.C. (2019). Performance and economic viability of broiler chickens fed with probiotic and organic acids in an attempt to replace growth-promoting antibiotics. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21. doi: 10.1590/1806-9061-2018-0912.

47. Chang, C. H., Teng, P. Y., Lee, T. T., & Yu, B. (2019). Effects of Multi-Strain Probiotics Combined with *Gardeniae fructus* on Intestinal Microbiota, Metabolites, and Morphology in Broilers. *The journal of poultry science*, 56(1), 32–43. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170179>.

48. Reuben, R.C., Sarkar, S.L., Ibnat, H., Setu, M.A.A., Roy, P.C., Jahid, I.K. (2021). Novel multi-strain probiotics reduces *Pasteurella multocida* induced fowl cholera mortality in broilers. *Sci. Rep*, 11(1), 8885. doi: 10.1038/s41598-021-88299-0.

49. Bortoluzzi, C., Serpa Vieira, B., de Paula Dorigam, J. C., Menconi, A., Sokale, A., Doranalli, K., & Applegate, T. J. (2019). *Bacillus subtilis* DSM 32315 Supplementation Attenuates the Effects of *Clostridium perfringens* Challenge on the Growth Performance and Intestinal Microbiota of Broiler Chickens. *Microorganisms*, 7(3), 71. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030071>.

50. Jadhav, S. R., Shandilya, U. K., & Kansal, V. K. (2012). Immunoprotective Effect of Probiotic Dahi Containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on Dextran Sodium Sulfate-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4(1), 21–26. <https://doi.org/10.1007/s12602-011-9087-2>.

51. Kondepudi, K. K., Ambalam, P., Karagin, P. H., Nilsson, I., Wadström, T., & Ljungh, Å. (2014). A novel multi-strain probiotic and synbiotic supplement for prevention of *Clostridium difficile* infection in a murine model. *Microbiology and immunology*, 58(10), 552–558. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12184>.

52. Okolo, C. C., Nweze, N. E., & Eze, I. J. (2020). Hematobiochemical and Immunological Responses of Rats Treated with Multi-strain Probiotics and Infected with *Trypanosoma brucei*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(3), 952–960. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09592-z>.

53. Mancini, S., & Paci, G. (2021). Probiotics in Rabbit Farming: Growth Performance, Health Status, and Meat Quality. *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(12), 3388. <https://doi.org/10.3390/ani11123388>.

54. Кассіч В. Ю., Нечипоренко О. Л. Вплив пробіотичних препаратів на мікроорганізми рубця. *Вісник Сумського Національного аграрного університету. Серія "Ветеринарна медицина" Випуск 2 (49), 2020. С. 3–9.*

55. Бербенець, О. В., Гогітідзе, Н.А. Використання пробіотиків в тваринництві та птахівництві. *Птахівництво. 2009,64, 135-140.*

56. Iegorov, V., Kananykhina, O., Turpurova, T. (2021). Probiotic feed additives in fattening of agricultural animals. *Grain Products and Mixed Fodder's*. 21, 4, 25-31.

57. Параняк, Р. П., Калин, Б. М., Нагірняк, Т. Б. (2018). Значення та доцільність застосування пробіотиків. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія : Ветеринарні науки, 20, 87, 116-121.*

58. Перспективи використання пробіотиків для профілактики та лікування дисбактеріозів птахів / Ю. О. Черевань, О. І. Сідашенко, К. І. Тимчий, С. В. Федота, Р. Д. Волков // *Вісник проблем біології і медицини. - 2018. - Вип. 4(2). - С. 77-84.*

59. Li C.L., Wang J., Zhang H.J., Wu S.G., Hui Q.R., Yang C.B., Fang R., Qi G.H. Intestinal morphologic and microbiota responses to dietary *Bacillus* spp.

in a broiler chicken model. *Front. Physiol.* 2019, 9, 1968. doi: 10.3389/fphys.2018.01968.

60. Ouwehand A.C., Invernici M.M., Furlaneto F.A., Messori M.R. Effectiveness of multi-strain versus single-strain probiotics: current status and recommendations for the future. *J. Clin. Gastroenterol.* 2018, 52, S35-S40. doi: 10.1097/MCG.0000000000001052.

61. Gong L., Wang B., Mei X., Xu H., Qin Y., Li W., Zhou Y. Effects of three probiotic *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidative capacity, serum immunity, and biochemical parameters in broilers. *Anim. Sci. J.* 2018, 89(11), 1561-1571. doi: 10.1111/asj.13089.

62. Gao J., Wang R., Liu J., Wang W., Chen Y., Cai W. Effects of novel microecologies combined with traditional Chinese medicine and probiotics on growth performance and health of broilers. *Poult. Sci.* 2022, 101(2), 101412. doi: 10.1016/j.psj.2021.101412.

63. Khochamit N., Siripornadulsil S., Sukon P., Siripornadulsil W. *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria improve the growth performance and blood parameters and reduce *Salmonella* infection in broilers. *Vet. World.* 2020, 13(12), 2663. doi: 10.14202/vetworld.2020.2663-2672.

64. Частка курей української селекції становить 30% [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://agronews.ua/news/chastka-kurej-ukrayinskoyi-selekcyiyi-stanovyt-30/#:~:text=%D0%A9%D0%BE%D1%80%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%BE%20%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D1%80%D1%81%D1%8C%D0%BA%D1%96%20%D1%82%D0%B0%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%D1%81%D0%B0%D0%B4%D0%B8%D0%B1%D0%BD%D1%96%20%D0%B3%D0%BE%D1%81%D0%BF%D0%BE%D0%B4%D0%B0%D1%80%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B0,%D1%82%D0%B0%D0%BA%D0%BE%D0%B6%201%2C5%20%D0%BC%D0%BB%D0%BD%20%D1%96%D0%BD%D0%B4%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2>.

65. Імунобактерин D пробіотик імуномодулятор, 200 гр порошок [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://24vet.in.ua/p1552187303-immunobakterin-probiotik-immunomodulyator.html/> .

66. СКІЛЬКИ КОРМУ З'ІДАЄ БРОЙЛЕР ДО ЗАБОЮ, І ЯК РОЗРАХУВАТИ ЗАГАЛЬНИЙ ОБСЯГ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://jak.koshachek.com/articles/skilki-kormu-z-idae-brojler-do-zaboju-i-jak.html>

67. Як вирощувати бройлерів в домашніх умовах? [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://www.kramar.ua/company/news/yak\\_vyroshchuvaty\\_broyleriv\\_v\\_domashni\\_kh\\_umovakh/#:~:text=%D0%94%D0%BE%20%D0%B7%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%8E%20%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%85%20%D0%B3%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%D1%83%20%D0%B2%D1%96%D1%86%D1%96%2035%2D42%20%D0%B4%D0%BD%D1%96%D0%B2.](https://www.kramar.ua/company/news/yak_vyroshchuvaty_broyleriv_v_domashni_kh_umovakh/#:~:text=%D0%94%D0%BE%20%D0%B7%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%8E%20%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%85%20%D0%B3%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9%20%D1%83%20%D0%B2%D1%96%D1%86%D1%96%2035%2D42%20%D0%B4%D0%BD%D1%96%D0%B2.)

68. Нечипуренко, О & Хархота, М & Бордунос, К & Авдеева, Л. (2015). GROWTH AND CAROTENE SYNTHESIS BY THE STRAINS BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS UCM B-5113 AND B. SUBTILIS 1.1 AT SUBMERGED CULTIVATION. *Microbiology&Biotechnology*. 41-48. 10.18524/2307-4663.2015.2(30).48073.

69. Bhattacharya, Raikamal & Singh, HareRam & Jha, Santosh. (2016). THERMOKINETIC STUDIES OF PRODUCTION OF L-ASPARAGINASE BY BACILLUS LICHENIFORMIS IN BATCH FERMENTATION.. *International Journal of Advanced Research*. 4. 1670-1677. 10.21474/IJAR01/608.

70. Rajeswari Uppala, Krishnan Sundar and Azhaguchamy Muthukumaran, Decolorization of Azo Dyes using Dried Biomass of *B. cereus* RC1 and *Kocuria kristinae* RC3, *J Pure Appl Microbiol.*, 2019; 13(4):1969-1976. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.4.08>.

71. Вовк, С.О., Дмитроца, А.І., Польовий, І.В., Бучинський, В.М. (2021). Пробиотики у годівлі тварин і птиці. *Передгірне та гірське землеробство і тваринництво*, 69, 157–168.

72. Калініченко, С. В., Бабич, Є. М., Рижкова, Т. А., Маслій, І. Г., Коротких, О. О., Даніліна, С. С., Солянік, О. Г., Шикова, О. А., Скляр, Н. І., Балак, Л. М., Нємкова, А. К., Десятникова, С. М., О. В. Ткач. (2013). Сучасний стан розробки та застосування пробіотичних, пребіотичних та синбіотичних препаратів. *Аннали Мечниковського інституту*, 3, 5-12.

73. Krysiak, K., Konkol, D., & Korczyński, M. (2021). Overview of the Use of Probiotics in Poultry Production. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(6), 1620. <https://doi.org/10.3390/ani11061620>.

74. Імунобактерин D пробіотик імуномодулятор, 200 гр порошок [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://24vet.in.ua/p1552187303-immunobakterin-probiotik-immunomodulyator.html/> ..

75. Лясота, В.П., Дюба, А.В. (2023). Вплив пробіотичного препарату “Біосевен” на метаболізм лабораторних тварин (токсикологічна характеристика). *Матеріали науково-практичної онлайн конференції «Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я» (м. Львів, 1–2 червня 2023 р.)*, 72-74.

76. Пробиотик МАКС, порошок 1,5 г [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://loopyvet.com/product/probiotytk-maks-poroshok-15-g/>.

77. КАЛЬЦІЙ КАРБОНАТ [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3419/kalcij-karbonat> .

78. Magnesium Carbonate [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://file.wuxuwang.com/hpe/HPE6/HPE6\\_174.pdf](https://file.wuxuwang.com/hpe/HPE6/HPE6_174.pdf) .

79. Sucrose Excipient | Uses, Suppliers, and Specifications [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://pharmacentral.com/product/sucrose-pharmaceutical-excipient/#:~:text=Applications%20in%20Pharmaceutical%20Formulations%20or>



[%20Technology&text=Powdered%20Sucrose%20functions%20as%20a,in%20che  
wable%20tablets%20and%20lozenges.](#)

80. Sabah, Dr & Ahmed, Iqbal & Arsalan, Adeel & Arif, Aysha & Tanwir, Sidra & Abbas, Atta & Ahmed, Farrukh. (2014). Features, Functions and selection of Pharmaceutical Packing Materials. *Inter J of Pharm Neutra Res. 1.* 1-12.

81. Сорока, В.І, Божок, Л.В., Дерев'янка, С.В., Дяченко, Г.М., Прокопенко, О.І., Агеев, В.О. (2009). Властивості штамів мікроорганізмів *Lactobacillus plantarum* L5 і *Bacillus subtilis* В3 та перспективи їх застосування у тваринництві. *Сільськогосподарська мікробіологія.: Міжвід. темат. наук. зб. Чернігів*, 10, 124-132.

82. Технологія пробіотиків : підручник / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. – К.: НУХТ, 2012. - 318 с.

83. Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт та організації самостійної роботи з дисципліни «Спеціальна ветеринарна мікробіологія» для студентів спеціальності 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза» для аграрних вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації. 2019 – 77 с.

84. Wang, H., Guo, J., Chen, X., & He, H. (2023). The Metabolomics Changes in Luria–Bertani Broth Medium under Different Sterilization Methods and Their Effects on *Bacillus* Growth. *Metabolites*, 13(8), 958. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/metabo13080958>.

85. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. – К.:НУХТ, 2022. –373 с.

86. Шугай, М., & Чорна, Н. (2021). Сублімаційне сушіння бактеріальних препаратів на основі *Lactobacillus casei*. *Продовольчі ресурси*, 9(17), 174-181. <https://doi.org/10.31073/foodresources2021-17-18>.

87. Технологічні аспекти одержання пробіотиків / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Ю. М. Дорошко // Наукові праці

Національного університету харчових технологій. - 2014. - Т. 20, № 4. - С. 69-77.

88. BACTERIAL FREEZE DRYING PROTOCOL [Електронний ресурс] – режим доступу:

<https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/rpbacteriafdprotocol.htm> .

89. Крупицька Л.О. Розробка технології синбіотичних біологічно активних добавок : дис. канд. техн. наук : 03.00.20 / Л.О. Крупицька. – Одеса, 2018. – 246 с.

90. Дозатор для сипучих продуктів NPF-3000-201 Hualian [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://cicada.in.ua/dozator-dlya-sipuchih-produktiv-npf-3000-201-hualian?srsId=AR57-fCQ0l4lI7IVMXz4WuFBm092oYNN7DFJe1b8Qb3EZp6sRD5gS\\_2X\\_tg](https://cicada.in.ua/dozator-dlya-sipuchih-produktiv-npf-3000-201-hualian?srsId=AR57-fCQ0l4lI7IVMXz4WuFBm092oYNN7DFJe1b8Qb3EZp6sRD5gS_2X_tg)

91. Фильтропалотно - тканина Петрянова ФПП-15-1,5 (ФПП-15-1.5) для масок розмір 150 см х 90 см, площа 1,35 м. кв. [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1007285209-filtropalotno-tkan-petryanova.html>

92. ЦТК на 2000 літрів [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://termopab.com.ua/ua/p590132908-tskt-2000-litrov.html>

93. Насос 2CDX 70/15, 380V [Електронний ресурс] – режим доступу: [https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console\\_pumps/nasos-2cdx-70-15-380v/](https://prom-nasos.com.ua/ua/catalog/pumps-by-type/console_pumps/nasos-2cdx-70-15-380v/)

94. HAUS DDE 2342 декантерна центрифуга для розділення осаду [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://prom-nasos.com.ua/ua/applications/decanter-centrifuges-separators/haus-dde-2342-dekanterna-centrifuga-dlya-rozd-lennya-osadu/>

95. Реактор об'ємом 300 літрів [Електронний ресурс] – режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-obyomom-300-litrov/>

96. GALDI RG250 UCS FILLING MACHINE WITH TRAY PACKER – 5000 PCK/H (REF. NO.: F2310074) [Електронний ресурс] – режим доступу:

<https://me-trading.de/product/galdi-rg250-ucs-filling-machine-with-tray-packer-5000-pck-h/> .

97. Промышленная установка для сублимационной сушки лиофилизатора LG-30 большого объема, 300 к [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://flagma.ua/uk/promyshlennaya-ustanovka-dlya-sublacionnoy-o11530922.html> .

98. 20 л вертикальный резервуар для зберігання з нержавіючої сталі [Электронный ресурс] – режим доступа: [https://perryvidex.eu/?product\\_cats=&s=20+%D0%BB](https://perryvidex.eu/?product_cats=&s=20+%D0%BB)

99. Дробарка ДМБ-М МПМЗ [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://hydrolider.com.ua/ua/p822178830-drobilka-dmb-mpmz.html> .

100. Фірма «Технік» ТОВ ВИБРОПРОСІВАЧ ВП-800 ПАСПОРТ ФТ922.00.00.00 ПС [Электронный ресурс] – режим доступа: [https://technik.ua/images/pdf/vpros\\_ukr.pdf](https://technik.ua/images/pdf/vpros_ukr.pdf) .

101. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 1. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 360 с.

102. Lindsay, D., Collin, R., & van Hekezen, R. (2020). Microorganisms in Milk Powders. *Reference Module in Food Science*. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.22974-0.

103. Bacillus licheniformis [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.vetbact.org/?artid=12> .

104. McDowell, R. H., Sands, E. M., & Friedman, H. (2023). Bacillus Cereus. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.