

**Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького**

Факультет харчових технологій та біотехнологій

(повна назва факультету)

Кафедра біотехнологій та радіології

(повна назва кафедри)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за ОС «Бакалавр»

**на тему: “Біотехнологія мікробних препаратів та використання
пробіотичних препаратів у тваринництві”**

Виконала: студентка 4 курсу, групи 1
спеціальності

162 «Біотехнологія та біоінженерія»

Бондар Ірина Віталіївна

(прізвище та ініціали)

Керівник д.с.-г.н., **проф. Буцяк В.І.**

(прізвище та ініціали)

Рецензент д.с.-г.н., **проф. Півторак Я.І.**

(прізвище та ініціали)

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнологій та радіології і
рекомендована до захисту в ЕК, протокол № від червня 2026 р.

Завідувач кафедри біотехнологій та радіології,
професор, доктор с.-г. наук

Буцяк В.І.

Львів – 2026

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	3
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Концепція пробіотикотерапії в системі біобезпеки тваринництва	9
1.2. Біологічні властивості та переваги бактерій роду <i>Bacillus</i>	16
1.3. Порівняльна характеристика пробіотичних груп мікроорганізмів	20
1.4. Біотехнологічні аспекти культивування та стабілізації пробіотиків кормового призначення та їх вплив на імунну відповідь та метаболізм тварин	24
1.5. Світовий та вітчизняний досвід щодо нормативно-правового регулювання використання пробіотиків	29
РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	32
2.1. Опис стадій технологічного процесу одержання пробіотику кормового призначення	32
2.2. Матеріал та методи досліджень	50
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
3.1. Скринінг антагоністичної активності штамів <i>Bacillus subtilis</i>	53
3.1.1. Оптимізація параметрів культивування для максимального виходу спор <i>B. subtilis</i>	55
3.1.2. Вплив пробіотичного препарату розробленого на основі штаму <i>B. subtilis</i> на продуктивні якості поросят-сисунів	59
ВИСНОВКИ	62
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	63
ДОДАТКИ	67

АНОТАЦІЯ

Загальний обсяг роботи становить 68 сторінок машинописного тексту. Структурно дослідження включає вступ, три основні розділи (теоретичний огляд, методику та аналіз результатів), висновки, список використаних джерел із 35 найменувань та додатки. Матеріал ілюстровано 3 рисунками та 19 таблицями.

Ключові слова: пробіотики, *Bacillus Subtilis*, термостабільність, пребіотики, синбіотики, кормові препарати, гранулювання, поросята, еритроцити, фармацевтичний ринок.

Актуальність теми. Глобальна стратегія «Єдине здоров'я» (One Health), підтримана ВООЗ та ФАО, визначає прямий зв'язок між здоров'ям тварин, людей та навколишнього середовища. Однією з найбільших загроз цій концепції є поширення антибіотикорезистентних штамів патогенів. Використання антибіотиків як стимуляторів росту (growth promoters) у тваринництві призводить до накопичення залишків препаратів у м'ясі, молоці та яйцях, що створює ризики для здоров'я споживачів.

У цьому контексті біотехнологія мікробних препаратів виступає інноваційним інструментом біозахисту. Пробіотики не просто замінюють антибіотики, а виконують функцію «біологічних коректорів», які нормалізують мікробіоценоз кишечника, синтезують вітаміни групи В, К та незамінні амінокислоти.

Проте ключовою проблемою сучасної біотехнології залишається стабілізація життєздатності мікроорганізмів: як доставити бактерію через кисле середовище шлунку до місця її локалізації в активному стані. Розробка нових форм мікрокапсулювання та оптимізація поживних середовищ для культивування є критично важливими науковими завданнями.

Обґрунтування проблеми. Незважаючи на широкий асортимент імпортованих пробіотиків, існує гостра потреба у вітчизняних препаратах, що базуються на «автохтонних» (місцевих) штаммах, які є найбільш адаптованими до кормової бази та умов утримання тварин у нашому регіоні. Це робить вивчення процесів ферментації та селекції штамів-продуцентів стратегічно важливим для продовольчої безпеки України.

Об'єкт дослідження: Біотехнологічні процеси виробництва пробіотиків та функціональна мікрофлора шлунково-кишкового тракту тварин.

Предмет дослідження: технологічні властивості та ефективність застосування пробіотичних кормових препаратів, створених на основі штаму *Bacillus subtilis* 22 у живленні поросят.

Мета дослідження: Теоретичне та практичне обґрунтування біотехнологічних параметрів отримання ефективних мікробних препаратів та оцінка їхнього біологічного впливу на фізіологічний стан і продуктивність сільськогосподарських тварин.

Завдання дослідження:

- проаналізувати еволюцію використання пробіотиків у тваринництві в умовах посилення екологічних стандартів;
- визначити оптимальні джерела Карбону для максимізації виходу біомаси пробіотичних культур;
- дослідити антагоністичну активність обраних мікроорганізмів щодо збудників колібактеріозу та сальмонельозу;
- вивчити скринінг антагоністичної активності штамів *Bacillus subtilis*;
- експериментально дослідити вплив пробіотичного препарату розробленого на основі штаму *B. subtilis* на продуктивні якості та гематологічні показники поросят;
- обґрунтувати економічну доцільність впровадження біотехнологічних препаратів у технологічний цикл вирощування тварин.

Наукова новизна: Полягає в удосконаленні складу живильних середовищ для вирощування специфічних штамів та уточненні механізмів їхньої взаємодії з імунною системою тварин на різних стадіях онтогенезу.

Практичне значення. Розроблені рекомендації щодо режимів ферментації та дозування препарату можуть бути впроваджені на біозаводах та у тваринницьких господарствах для заміщення кормових антибіотиків, що дозволить підвищити рентабельність виробництва.

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ББ – бактеріальна безпека;
БГКП – бактерій групи кишкової палички;
ВООЗ – всесвітня організація охорони здоров'я;
ВДІ – води для ін'єкцій;
ДФУ – Державна Фармакопея України;
ЗМЧ – загального мікробного числа;
ЗІЗОД – засоби індивідуального захисту органів дихання;
КУО – колонієутворювальні одиниці;
МКБ – молочнокислі бактерії;
МЧ – мікробіологічна чистота;
СОП – стандартна операційна процедура;
СТП – стандарт підприємства;
ТУ – технічні умови;
ТПВ – тверді побутові відходи;
ШКТ – шлунково-кишковий тракт;
ФАО – Продовольча та сільськогосподарська організація ООН;
ФЯР – фільтри ячейкові регенераційні;
EFSA – Європейське агентство з безпеки харчових продуктів;
GMP – належна виробнича практика;

ВСТУП

Сучасна концепція розвитку світового тваринництва базується на принципах інтенсифікації виробництва при суворому дотриманні екологічних та санітарно-гігієнічних норм. Однією з найбільш гострих проблем галузі протягом останнього десятиліття залишається масове поширення інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ) сільськогосподарських тварин, що призводить до значних економічних збитків через падіж молодняка, зниження конверсії корму та витрати на ветеринарні заходи.

Історично склалося, що основним інструментом боротьби з цими викликами були кормові антибіотики. Проте безконтрольне та тривале їх застосування спричинило глобальну кризу – виникнення штамів мікроорганізмів з багатофункціональною резистентністю (так званих «супербактерій»). Це явище загрожує не лише ветеринарії, а й охороні здоров'я людей через ланцюги харчування [1].

Впровадження в Україні європейських стандартів безпечності харчових продуктів (відповідно до Регламенту ЄС № 1831/2003) вимагає повної відмови від антибіотиків-стимуляторів росту. У зв'язку з цим, пошук біотехнологічних альтернатив, здатних ефективно замінити хіміотерапевтичні засоби без втрати продуктивності тварин, є критично важливим завданням для вітчизняної аграрної науки.

Найбільш перспективним напрямком сучасної біотехнології є розробка та впровадження мікробних препаратів на основі пробіотиків. Пробіотики – це живі мікроорганізми, які при введенні в адекватній кількості справляють позитивний вплив на здоров'я макроорганізму шляхом нормалізації його мікробіоценозу. На відміну від антибіотиків, які стерилізують кишечник, знищуючи як патогенну, так і корисну мікрофлору, пробіотичні препарати діють вибірково. Вони відновлюють біологічний

бар'єр слизової оболонки, активують синтез ендогенних вітамінів та ферментів, що сприяє глибшому засвоєнню поживних речовин корму [2].

Особливе місце в ієрархії пробіотиків займають представники роду *Bacillus*. Їхня унікальна біологічна особливість – здатність до спороутворення – робить їх ідеальними об'єктами для промислової біотехнології. Споріві пробіотики характеризуються екстремальною стійкістю до технологічних факторів (високий тиск та температура при гранулюванні кормів) та фізіологічних бар'єрів (низький рН шлункового соку, вплив жовчних кислот). Це дозволяє забезпечити високу біодоступність та стабільність препарату протягом усього терміну зберігання [3].

Аналіз наукових праць вітчизняних та зарубіжних вчених свідчить про те, що ефективність пробіотика безпосередньо залежить від штаму-продуцента та технології його отримання. Попри наявність на ринку великої кількості імпортованих препаратів, актуальним залишається створення вітчизняних продуктів на основі «автохтонних» (місцевих) штамів, які пройшли сувору селекцію за ознаками антагоністичної активності, швидкості росту та здатності до колонізації епітелію [4].

Проблема стабілізації титру корисних бактерій у готових формах препаратів залишається відкритою. Використання методів ліофілізації, мікрокапсулювання та підбір оптимальних поживних субстратів (як-от вторинні продукти переробки агросировини) дозволяє не лише підвищити якість продукту, а й знизити його собівартість, що є ключовим фактором для великих тваринницьких комплексів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Концепція пробіотикотерапії в системі біобезпеки тваринництва

Історія використання пробіотиків бере початок від праць Іллі Мечникова, проте їхнє промислове застосування у тваринництві активізувалося лише на межі XX та XXI століть. Сучасна концепція розглядає пробіотики не просто як кормові добавки, а як інструмент керування метаболізмом тварини.

Згідно з визначенням ВООЗ/ФАО, пробіотики – це живі мікроорганізми, які при застосуванні в адекватних кількостях забезпечують користь для здоров'я господаря. У тваринництві їхня роль трансформувалася: від засобів лікування діареї до цілісних систем підтримки гомеостазу [5].

Пробіотики – це спеціалізовані кормові та лікувальні засоби, спрямовані на стабілізацію мікробіоценозу кишечника тварин. Завдяки вмісту штамів корисних бактерій, ці добавки пригнічують розвиток патогенної мікрофлори шляхом конкурентного витіснення. Відновлення бактеріального балансу сприяє інтенсифікації процесів травлення та кращій абсорбції нутрієнтів.

У сучасній науковій літературі виділяють чотири основні класи препаратів, що різняться за складом, механізмом дії та біотехнологічною складністю виробництва [11].

Монокультури (препарати першого покоління) – це класичні пробіотики, що містять лише один селекціонований штам мікроорганізмів (наприклад, *Bacillus subtilis* або *Lactobacillus acidophilus*). Мають чітко спрямовану дію, використовуються переважно для вивчення специфічних властивостей конкретного виду бактерій [7].

Переваги у використанні: простота у виробництві, легкість стандартизації титру (кількості) клітин, низька собівартість, недоліки: вузький спектр дії. Оскільки мікробіом кишечника тварин є мультиспівесним

(складається з тисяч видів), одна монокультура не завжди здатна ефективно відновити баланс при глибоких дисбактеріозах.

Мультиштамні та багатокомпонентні препарати (друге та третє покоління) – це складні системи, що містять кілька штамів одного виду (мультиштамні) або суміш різних видів бактерій та дріжджів (багатокомпонентні), наприклад, поєднання *Bacillus subtilis* (аероб) та *Lactobacillus* (анаероб). Бацили споживають кисень у кишечнику, створюючи ідеальні умови для приживлення лактобактерій [10].

Переваги у використанні: синергічний ефект, різні штами діють на різних рівнях шлунково-кишкового тракту та пригнічують ширший спектр патогенів, біотехнологічний виклик – перевірка штамів на антагоністичну сумісність (не можна поєднувати бактерії, які пригнічують ріст одна одної в технологічному процесі одержання препарату) [6].

Синбіотики – це препарати, що поєднують у собі пробіотик (живі бактерії) та пребіотик (неперетравлювані компоненти корму, що є їжею для цих бактерій). Найчастіше це бактерії роду *Bacillus* або *Bifidobacterium* + інулін, лактулоза чи фруктоолігосахариди (ФОС) [12]. Пребіотик забезпечує пробіотичному штаму поживний ресурс на перший час після потрапляння в організм тварини, що значно підвищує відсоток приживлюваності та швидкість розмноження корисної мікрофлори.

Метабіотики (постбіотики) – це найновіший напрям у біотехнології (четверте покоління). Вони не містять живих клітин, а складаються з продуктів їхнього метаболізму та структурних компонентів (ферменти, бактеріоцини, органічні кислоти та фрагменти клітинних стінок (пептидоглікани). Оскільки в них немає живих бактерій, вони не потребують класичних елементів живлення та є стійкими до антибіотиків.

Діють миттєво після потрапляння в організм, мають надзвичайно тривалий термін зберігання та повну безпечність, оскільки відсутній ризик передачі генів резистентності [8].

Найбільш інноваційним напрямом сучасної біотехнології є розробка препаратів V покоління (рекомбінантні та генно-інженерні препарати), створені на основі штамів із цілеспрямовано зміненим геномом. За допомогою методів генетичної інженерії (наприклад, системи CRISPR/Cas9) у геном стабільного штаму-носія (найчастіше *Bacillus subtilis* або *Escherichia coli* Nissle 1917) вбудовуються гени, що відповідають за синтез дефіцитних сполук.

Створення пробіотиків, які безпосередньо в кишечнику синтезують противірусні білки (інтерферони), що критично важливо при спалахах вірусних діарей у поросят та телят.

Таблиця 1.1.

Пробіотичні препарати різних поколінь [15]

Пробіотики	Склад мікрофлори	Концентрація клітин, КУО/дозу
I покоління — пробіотики на основі монокультур облігатної або факультативної нормофлори		
Біфідумбактерин	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	10^9
Колібактерин	<i>Escherichia coli</i>	10^9
Лактобактерин	<i>Lactobacillus fermentum</i> або <i>Lactobacillus plantarum</i>	10^8
II покоління — 2-4-компонентні пробіотики на основі облігатної, факультативної або транзитornoї флори		
Біфікол	<i>B. bifidum</i> , <i>E. coli</i>	10^8
Біфіформ	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	10^7
Лінекс	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>E. faecium</i>	10^7
Капсули йогурту	<i>L. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	10^9
Симбіолакт композитум	<i>L. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i>	10^9
III покоління — пробіотики на основі транзитornих мікроорганізмів		
Бактисубтил	<i>Bacillus cereus</i>	10^9
Біоспорин	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	10^9
Ентерол-250	<i>Saccharomyces boulardii</i>	10^7
А-бактерин (Аеробакт)	<i>Aerococcus viridans</i>	10^8
Лактовіт форте	<i>Lactobacillus sporogenes</i> , <i>Bacillus coagulans</i>	10^8
IV покоління — синбіотики (комбінація пробіотиків і пребіотиків) та іммобілізовані пробіотики		

Пробіотики	Склад мікрофлори	Концентрація клітин, КУО/дозу
Екстралакт	<i>L. acidophilus</i>	10^8
Біфілакт-екстра	<i>B. bifidum</i>	10^8
Біфідумбактерин-форте	<i>B. bifidum</i>	10^7
Пробіфор	<i>B. bifidum</i>	10^8
V покоління — препарати на основі рекомбінантних генно-інженерних штамів		
Субалін	<i>B. subtilis</i>	10^9
VI покоління — полікомпонентні пробіотики на основі лактобацил і біфідобактерій		
Probiotic	<i>Lactobacillus</i>	10^9
Symbiolact	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	10^{10}
Біфідум-Мульти-1,2,3	<i>Bifidobacterium</i>	10^9
Полібактерин	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	10^9
VII покоління — мультипробіотики		
Симбітер	<i>Bifidobacterium, Lactobacillus, Propionibacterium, Lactococcus</i>	10^9
Симбітер концентрований		10^{13}
Симбітер-2		10^{12}
Симбітер-М		$10^9 - 10^{12}$
Апібакт		10^{12}

Синтез специфічних ферментів (штами, здатні розщеплювати складні некрохмалисті полісахариди (ксилани, глюкани) зернових кормів, що раніше було неможливим для звичайних бактерій).

Вазоактивні пептиди (можливість синтезу гормоноподібних речовин, що регулюють апетит та швидкість метаболізму тварини). Використання препаратів V покоління суворо регламентується. Ключовою вимогою є наявність «генів-самовбивць» (suicide genes), які не дозволяють рекомбінантному штаму виживати у зовнішньому середовищі поза організмом тварини, щоб запобігти неконтрольованому поширенню ГМО в екосистемі [9].

За класичною класифікацією, яку розробив Шендерович, зазвичай виділяють V покоління пробіотиків, однак сучасна біотехнологія вже виокремила нові класи препаратів пробіотиків VI та VII покоління (табл. 1.1).

Яскравим прикладом практичної реалізації V покоління пробіотиків на сучасному ринку є препарат «Субалін». В його основі лежить рекомбінантний штам *Bacillus subtilis* 2335/105, який завдяки методам генної

інженерії містить плазмиду з геном інтерферону α -2 людини [14, 16]. Унікальність цього препарату полягає в синергізмі двох факторів – природний антагонізм *B. subtilis*: пригнічення широкого спектра патогенних бактерій (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*).

Постійна секреція інтерферону α -2 спонукає клітини макроорганізму до синтезу противірусних білків, що робить препарат незамінним при лікуванні змішаних бактеріально-вірусних інфекцій, які є найбільш небезпечними для молодняка тварин та птиці.

Поєднання декількох видів мікроорганізмів у складі одного препарату дозволяє значно підвищити його біологічну активність. Це досягається за рахунок розширення спектру дії на патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, які виявляють чутливість до антагоністичних метаболітів обраних штамів.

Таблиця 1.2.

Реєстр пробіотичних препаратів, що пройшли державну реєстрацію в Україні [13].

Монокомпонентні препарати	Лактобактерин (суха речовина), Росія, Україна
	Біфідумбактерин (суха речовина), Росія
	Біо-Гая (каплі)
	Колібактерин (суха речовина), Україна
	А-Бактерин (суха речовина), Україна
Полікомпонентні	Біфіформ-бебі (каплі), Данія
	Лінекс (капсули), Словенія
	Біфіформ (капсули), Данія
	Біфікол (флакони), Україна
Комбіновані (симбіотики)	Лактовіт форте (капсули), Великобританія
	Лацидофіл (капсули), Україна
	Біфіформ дитячий (порошок)
	Лактив-ратіофарм (капсули, порошок, флакони), Італія
	Біфіформ комплекс (таблетки), Данія
Рекомбінантні	Субалін (суха речовина), Україна
	Хілак, хілак-форте (каплі), Германія
Самоелімінуючі	Бактисубтіл (капсули), Югославія
	Ентерожерміна (питні ампули), Франція
	Біоспорин (суха речовина), Росія
	Ентерол (суха речовина), Франція

Ключовим фактором є синергізм функцій біфідобактерії та лактобацили, які відіграють вирішальну роль у регуляції морфофункціонального стану слизової оболонки ШКТ та нормалізації його моторно-евакуаторної функції.

Завдяки створенню потужної колонізаційної резистентності, ці бактерії формують захисну біоплівку, яка перешкоджає транслокації (проникненню) патогенних мікробів у верхні відділи травного каналу та паренхіматозні органи, запобігаючи розвитку септичних процесів.

Ефективність пробіотичних бактерій обумовлена не лише їхньою присутністю, а й активним синтезом широкого спектра метаболітів, зокрема, органічних кислот. Продукуючи молочну, оцтову та пропіонову кислоти, пробіотики знижують рН середовища в кишечнику. Створення кислої реакції є критичним фактором, що попереджає розмноження патогенної, гнилісної та газоутворюючої мікрофлори, яка є чутливою до пониження рН в кислу сторону [17].

Зазначені бактерії здатні виділяти специфічні бактеріоцини (зокрема «Біфідин» та «Біфілонг»), які проявляють пряму антимікробну активність щодо ентеробактерій, вібріонів, стрептококів та стафілококів. Важливу роль відіграють також термостабільні антибіотики (лактоцидин, ацидофілін, лактолін, ацидолін) та перекиси, що формують агресивне середовище для збудників інфекцій.

Пробіотики беруть активну участь у гідролізі вуглеводів, продукуючи ферменти (лізоцим, лактаза), що покращує перетравність корму. Крім того, вони виступають як «біофабрики» вітамінів (групи В, С, Е, РР, Н), забезпечуючи потреби організму тварини в мікронутрієнтах.

Слід зазначити, що життєдіяльність та колонізаційна активність пробіотиків значно посилюється у присутності пребіотиків (лактолоза, інουλін, рафіноза, пектин, декстрин, ксилоза). Ці сполуки є селективним субстратом для росту корисної мікрофлори, що дозволяє створювати високоефективні синбіотичні комплекси [18].

Сучасні підходи до підтримання здоров'я та продуктивності базуються на концепції корекції порушень у мікробній екосистемі. Це стосується як ветеринарної медицини, так і гуманної практики, де використовується широкий спектр бактеріо-терапевтичних препаратів і продуктів функціонального харчування, збагачених пробіотичними мікроорганізмами.

Такі продукти не лише забезпечують організм поживними речовинами, а й цілеспрямовано модифікують склад мікрофлори, підвищуючи резистентність до інфекцій та стресових факторів.

У тваринництві впровадження функціональних добавок дозволяє досягти стабільного біоценозу ШКТ, що є критичним для молодняка в перехідні періоди (відлучення, зміна раціону) [19].

Таблиця 1.3.

Класифікація засобів корекції мікробної екосистеми

Категорія засобів	Характеристика та компоненти	Приклади, штами
Бактеріотерапевтичні препарати	Висококонцентровані форми живих клітин (ліофілізати)	Монокультури, Субалін (V пок.)
Функціональні продукти	Кормові добавки/продукти, збагачені пробіотиками	Ферментовані корми, закваски
Синбіотики	Комбінація пробіотика та пребіотика (інулін, пектин)	Комплекси з лактулозою
Метабіотики	Структурні компоненти та метаболіти (бактеріюцини)	Продукти лізису клітин

Попри широку представленість пробіотиків на ринку України, актуальним завданням залишається їхня технологічна модернізація. Пріоритетними напрямками вдосконалення є [20]:

- поглиблене вивчення фізіолого-біохімічних властивостей штамів-продуцентів для оптимізації умов їхнього культивування;

- дослідження сорбційних та адгезивних характеристик бактерій, а також механізмів їхньої антагоністичної дії через аналіз метаболітів;
- проєктування багатокомпонентних бактеріальних консорціумів із взаємодоповнювальним спектром активності;
- впровадження інноваційних лікарських форм (ентеросорбентів, захисних капсул, гелів тощо) для стабілізації біологічних властивостей препаратів;
- модернізація аналітичних методів контролю життєздатності мікроорганізмів у готових продуктах [19].

1.2. Біологічні властивості та переваги бактерій роду *Bacillus*

Препарати на основі *Bacillus subtilis* (сінної палички) характеризуються вираженою антагоністичною активністю щодо патогенних мікроорганізмів. Завдяки здатності ефективно елімінувати шкідливу флору з кишечника, ці пробіотики можуть розглядатися як альтернатива антибіотикотерапії. Штами даного виду відрізняються термостабільністю, проте критичний нагрів до 100°C спричиняє деструкцію клітин і втрату їхньої біологічної активності.

Бактерії роду *Bacillus* (зокрема *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*) займають особливе місце в біотехнології завдяки здатності до ендоспороутворення. Саме перебування у стані спори забезпечує їхню надзвичайну стійкість до агресивних чинників: шлункового соку, жовчі, а також термічної обробки під час гранулювання кормів.

Це дозволяє мікроорганізмам безперешкодно досягати кишечника, де вони переходять у вегетативну форму, проявляючи потужні антагоністичні властивості щодо патогенів. Така біологічна активність часто дозволяє

використовувати їх як ефективну альтернативу антибіотикам. У відповідь на стрес або дефіцит поживних речовин вегетативна клітина формує спору з багат шаровою оболонкою. Це забезпечує резистентність до ультрафіолету, дезінфектантів та, що найважливіше для живлення тварин, до термічної обробки кормів.

З технологічної точки зору використання спорових форм *B. Subtilis* є найбільш раціональним рішенням для комбікормової промисловості. Головною проблемою при введенні пробіотиків у корми є їхня деактивація в процесі екструдуювання та гранулювання, де поєднуються висока температура, вологість та механічний тиск [21].

Завдяки природній терморезистентності спор, препарати на основі сінної палички витримують ці агресивні процеси без втрати титру (кількості життєздатних одиниць), на відміну від нестабільних вегетативних мікроорганізмів. Це забезпечує рівномірний розподіл активної речовини в загальній масі корму, високу резистентність до впливу шлункового бар'єру (низький рН) та тривалий термін зберігання готової продукції без спеціальних температурних умов.

Таблиця 1.4

Порівняльна характеристика технологічних переваг спор *B. Subtilis* над вегетативними формами бактерій (такими як лакто- чи біфідобактерії)

Характеристика	Спорові форми (<i>B. subtilis</i>)	Вегетативні форми (<i>Lactobacillus</i> тощо)
Термостабільність	Витримують до 90-95°C (гранулювання)	Гинуть при температурі понад 45-50°C
Механічний тиск	Стійкі до пресування та екструзії	Чутливі до механічного руйнування клітин
Кислотостійкість	Легко проходять через кисле середовище шлунку	Значна частина гине під дією шлункового соку
Взаємодія з кислотами	Сумісні з органічними підкислювачами	Часто пригнічуються низьким рН у кормі
Зберігання	Стабільні протягом 2-3 років при кімнатній t	Вимагають холодильника та мають короткий термін
Хімічна стійкість	Резистентні до мінеральних солей та хлору	Чутливі до осмотичного тиску та важких металів

Важливою технологічною перевагою спор *B. Subtilis* також є їхня висока хімічна резистентність, що дозволяє без обмежень використовувати їх у складі складних преміксів та комбікормів. На відміну від чутливих лактоци біфідобактерій, спори сінної палички виявляють інертність до багатьох агресивних компонентів, а саме (табл. 1.4):

- спори зберігають стабільність навіть у кормах з високим вмістом підкислювачів, які зазвичай пригнічують ріст вегетативних клітин;
- висока концентрація солей у преміксах не викликає осмотичного шоку у спорових форм, що гарантує їхнє тривале виживання в сумішах;
- завдяки захисній оболонці, спори сумісні з більшістю хіміотерапевтичних засобів, що дозволяє використовувати їх у схемах комплексного лікування або профілактики.

Таблиця 1.5

Повна технологічна характеристика використання спорові форми (*B. Subtilis*) для виробництва кормового пробіотику

Характеристика	Спорові форми (<i>B. subtilis</i>)	Вегетативні форми (<i>Lactobacillus</i> тощо)
Термостабільність	Витримують до 90–95°C (гранулювання)	Гинуть при температурі понад 45–50°C
Механічний тиск	Стійкі до пресування та екструзії	Чутливі до механічного руйнування клітин
Кислотостійкість	Легко проходять через кисле середовище шлунку	Значна частина гине під дією шлункового соку
Взаємодія з кислотами	Сумісні з органічними підкислювачами	Часто пригнічуються низьким рН у кормі
Швидкість активації	Потребують 4–6 годин для «проростання»	Починають діяти миттєво після потрапляння
Зберігання	Стабільні протягом 2–3 років при кімнатній t°	Вимагають холодильника та мають короткий термін
Економіка виробництва	Нижчі витрати через відсутність браку при обробці	Високі витрати через необхідність мікрокапсулювання

Це робить пробіотики на основі сінної палички універсальним технологічним компонентом, який не потребує зміни рецептури корму чи

спеціальних методів внесення, за умови дотримання температурного режиму до 100°C. Повна технологічна характеристика наведена в табл. 1.5.

Хоча вегетативні форми активуються швидше, їхня надзвичайна вразливість робить їх використання в комбікормах складним і дорогим (через потребу в захисному капсулюванні). *B. Subtilis* виграє за рахунок «природного захисту», що дозволяє вносити її безпосередньо в змішувач перед термічною обробкою

Потрапляючи в тонку кишку, спори проростають (гермінація) у вегетативні клітини за 60–90 хвилин. У процесі життєдіяльності вони активно споживають вільний кисень, створюючи анаеробні умови, необхідні для розвитку корисної мікрофлори (лакто- та біфідобактерій).

Бацили є «природними біофабриками». Вони продукують понад 70 видів антибіотикоподібних речовин (наприклад, субтилін, сурфактин), які пригнічують ріст *Clostridium*, *Campylobacter* та *Salmonella*, не викликаючи при цьому дисбактеріозу. Рекомендовані дози пробіотичних препаратів, розроблених на основі *Bacillus subtilis* для різних видів тварин (табл. 1.6)

Таблиця 1.6

Кількість препарату залежить від концентрації КУО (колонієутворювальних одиниць) у 1 грамі, на 1 тонну готового корму

Вид тварин, птиці	Дозування (при 1х10 ⁹ КУО/г)	Ефект
Бройлери	400 – 800 г / тонну	Покращення однорідності стада, профілактика діареї
Кури-несучки	300 – 500 г / тонну	Покращення якості шкаралупи, подовження циклу кладки
Поросята-відлученці	500 – 1000 г / тонну	Зняття стресу відлучення, стабілізація ШКТ
Свині на відгодівлі	300 – 500 г / тонну	Максимальне засвоєння нутрієнтів, приріст маси
Телята (з молоком чи кормом)	2 – 5 г / голову на добу	Формування імунітету, профілактика дисбактеріозу

1.3. Порівняльна характеристика пробіотичних груп мікроорганізмів

Використання спороутворювальних бактерій у ролі пробіотиків потребує більш виваженого підходу порівняно з автохтонними лакто- та біфідобактеріями. Це зумовлено транзиторним (чужорідним) характером їхньої присутності в мікробіоценозі травного тракту, а також філогенетичною спорідненістю з небезпечними патогенами, такими як *B. Anthracis* або представники роду *Clostridium*.

Окремі штами *Bacillus*, зокрема *B. Mesentericus* та *B. subtilis*, відомі як збудники псування овочевих культур (картоплі) і за певних умов можуть провокувати аліментарні токсикоінфекції. Тому для об'єктивності доцільно порівняти спороутворюючі бацили з іншими популярними групами.

Лактобактерії характеризуються вираженими адгезивними властивостями, що дозволяє їм ефективно колонізувати слизову оболонку кишечника. Проте їхня висока чутливість до гідротермічних чинників суттєво ускладнює інтеграцію цих мікроорганізмів у промислові технології виготовлення комбікормів [22].

Молочнокислі бактерії *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* відіграють роль фундаменту здорового мікробіоценозу кишечника. Їхня дія є комплексною і спрямована на підтримку гомеостазу всього організму. Лакто- та біфідобактерії мають унікальну здатність міцно закріплюватися на слизовій оболонці кишечника. Створюючи суцільну біоплівку, вони фізично блокують доступ патогенам до епітелію, запобігаючи їхньому проникненню в кровотік.

Вони виробляють молочну, оцтову та пропіонову кислоти. Це знижує рівень рН у кишечнику до значень, за яких шкідливі бактерії (як-от *E. Coli* чи *Salmonella*) не можуть розмножуватися. Ці мікроорганізми синтезують специфічні білкові речовини, які цілеспрямовано знищують конкурентні патогенні штами.

Молочнокислі бактерії допомагають перетравлювати клітковину, білки та вуглеводи (зокрема лактозу), перетворюючи їх на легкозасвоювані форми. Лакто- та біфідобактерії є «міні-заводами» з виробництва вітамінів групи В (В₁, В₆, В₁₂), вітаміну К та фолієвої кислоти. Близько 70-80% імунних клітин тварини знаходяться в кишечнику. Молочнокислі бактерії стимулюють вироблення імуноглобулінів та активують макрофаги, що підвищує загальну резистентність організму до вірусів та інфекцій.

Вони здатні нейтралізувати токсини, які утворюються в процесі травлення або потрапляють із неякісним кормом, зменшуючи навантаження на печінку. Якщо спорові пробіотики (*B. subtilis*) діють як «швидка допомога» для витіснення патогенів, то лакто- та біфідобактерії – це постійні представники кишківнику організму як людини, так й тварин, які забезпечують довготривале здоров'я та імунітет [23].

Хоча лакто- та біфідобактерії часто згадують разом, вони мають чітку «спеціалізацію» та займають різні екологічні ніші в організмі тварини: лактобактерії (*Lactobacillus*) переважно заселяють тонкий кишечник та шлунок. Вони є «першою лінією оборони», оскільки саме тут починається основне розщеплення поживних речовин; біфідобактерії (*Bifidobacterium*) концентруються у товстому кишечнику. Це головні мешканці кінцевих відділів травного тракту, де вони відповідають за ферментацію залишків їжі та формування калових мас.

Лактобактерії спеціалізуються на синтезі молочної кислоти. Вони дуже ефективні у розщепленні лактози та пригніченні гнильних процесів у верхніх відділах ШКТ. Біфідобактерії, окрім молочної, синтезують велику кількість оцтової кислоти. Це створює потужніший антибактеріальний ефект проти патогенів, що присутні у товстому відділі кишечника (наприклад, клостридій).

Лактобактерії більше впливають на травлення: вони активують ферменти тварини, покращуючи засвоєння білків та жирів. Також вони відіграють ключову роль у підтримці бар'єрної функції слизової оболонки.

Біфідобактерії більше впливають на імунітет та детоксикацію: вони стимулюють синтез антитіл та лімфоцитів, а також активно нейтралізують амоніак та інші токсичні продукти розпаду, що утворюються в товстій кишці.

Біфідобактерії є домінуючими у молодняку (особливо в період підсосного періоду), складаючи до 90-95% всієї мікрофлори. Лактобактерії стають більш значущими з переходом на рослинні та комбіновані корми, допомагаючи розщеплювати складні вуглеводи. Найкращий результат дає поєднання обох видів (мультиштаммові препарати), оскільки це забезпечує захист кишечника по всій його довжині.

Пробіотичні дріжджі, зокрема штами *Saccharomyces cerevisiae* (та їхній підвид *S. boulardii*), займають особливе місце в годівлі тварин, оскільки вони не є бактеріями, а належать до одноклітинних грибів. Це надає їм унікальних технологічних та біологічних переваг, а саме [31]:

- дріжджі мають специфічні рецептори на своїй поверхні, до яких прикріплюються патогени (наприклад, *Salmonella* та *E. coli*). Замість того, щоб уражати стінки кишечника, шкідливі бактерії зв'язуються з дріжджами і виводяться з організму природним шляхом;
- *S. cerevisiae* споживають залишковий кисень у кишечнику, створюючи ідеальні анаеробні умови для росту лакто- та біфідобактерій;
- вони виробляють ферменти (протеази, ліпази), які допомагають розщеплювати складні компоненти корму, покращуючи його засвоюваність.

Для великої рогатої худоби дріжджі є критично важливими, а саме сприяють стабілізації рН, перешкоджаючи тим самим надмірному накопиченню молочної кислоти, запобігаючи виникненню ацидозу. Дріжджі стимулюють мікроорганізми, що розщеплюють клітковину, що призводить до збільшення споживання корму та підвищення надоїв молока.

Оскільки дріжджі – це гриби, на них не діють антибіотики. Це дозволяє використовувати їх одночасно з антибактеріальною терапією для відновлення мікрофлори. Сучасні форми сухих дріжджів (особливо сферичні гранули) витримують температуру гранулювання корму до 80-85°C. Вони

стійкі до низького рівня рН шлункового соку та дії жовчних кислот, а також стінки клітин дріжджів багаті на бета-глюкани та маннанолігосахариди (MOS). Ці сполуки є потужними імуномодуляторами, які активують захисні клітини організму та зв'язують мікотоксини (отрути грибів), що можуть міститися в кормі.

Отже, дріжджі – це не просто пробіотик, а й потужний сорбент та стимулятор травлення, особливо ефективний для жуйних тварин та свиней у періоди стресу.

В тваринництві використовують як живі дріжджі, так й дріжджових автолізатів (неживих продуктів), оскільки вони мають зовсім різне призначення в кормах (табл. 1.7)

Таблиця 1.7

Порівняльна характеристика живих дріжджів та дріжджових автолізатів [34].

Характеристика	Живі дріжджі (Пробіотик)	Дріжджові автолізати (Пребіотик/Добавка)
Стан клітини	Жива, біологічно активна клітина	Зруйнована клітина (розщеплена власними ферментами)
Механізм дії	Активно споживає кисень, виробляє ферменти та витісняє патогени	Діє як джерело поживних речовин (нуклеотидів, пептидів) та сорбент
Вплив на травлення	Покращує ферментацію (особливо в рубці ВРХ) та стабілізує рН	Стимулює ріст власної корисної мікрофлори кишечника
Склад компонентів	Живий метаболізм бактерій	Високий вміст бета-глюканів та маннанолігосахаридів (MOS)
Термостійкість	Чутливі до високих температур (потребують захисту при $>85^{\circ}\text{C}$)	Повністю термостабільні (не бояться екструзії та гранулювання)
Головна мета	Відновлення мікрофлори та профілактика ацидозу	Підтримка імунітету, сорбція токсинів та покращення смаку корму

1.4. Біотехнологічні аспекти культивування та стабілізації пробіотиків кормового призначення та їх вплив на імунну відповідь та метаболізм тварин

Виробництво пробіотичних препаратів – це високотехнологічний баланс між біологічною доцільністю та промисловою ефективністю. Хоча загальна схема здається лінійною, її складність полягає у забезпеченні життєздатності та метаболічної активності мікроорганізмів на кожному етапі.

Процес починається з відновлення маточної культури (ліофілізованого штаму), яку пасажують на селективні поживні середовища для активації росту. Сучасні дослідження спрямовані на використання дешевих субстратів. М'яса бурякова, молочна сироватка та зернова барда дозволяють знизити вартість препарату на 30-40%. Нарощування біомаси відбувається каскадним методом у ферментерах зростаючого об'єму.

Оптимізація рН, температури та аерації є критичною, оскільки найменше відхилення може призвести до зміни властивостей штаму або накопичення небажаних метаболітів.

Після завершення фази активного росту бактерії відокремлюють від поживного середовища за допомогою сепарації або ультрафільтрації. Отримана бактеріальна суспензія змішується з кріопротекторами (цукри, амінокислоти), які захищають мембрани клітин від руйнування під час подальшої обробки [24].

Найкращі результати дає ліофільна сушка (сублімація під вакуумом при низьких температурах), яка дозволяє зберегти до 98% живих клітин. Для спорових форм часто використовують розпилювальну сушку, яка є більш продуктивною та економічно вигідною.

Вибір форми залежить від цільової локалізації дії препарату та необхідного терміну придатності:

- рідка форма – найбільш фізіологічно активна, оскільки бактерії знаходяться у «робочому» стані разом із продуктами свого метаболізму. Має найменший термін зберігання;
- суха речовина (ліофілізат) – результат сублімаційного висушування у вакуумі. Клітини переходять у стан анабіозу, що дозволяє зберігати препарат тривалий час без втрати властивостей;
- капсули – забезпечують адресну доставку. Сучасні кишковорозчинні оболонки захищають пробіотик від агресивного впливу шлункового соку та жовчі;
- супозиторії – форма для локального введення, де жирова або водорозчинна основа забезпечує рівномірне вивільнення штаму на слизових оболонках (рис.1.1).

Завершальний етап – підрахунок КУО (колонієутворюючих одиниць), що підтверджує реальну кількість живих мікроорганізмів у дозі, та перевірка на генетичну стабільність штаму.

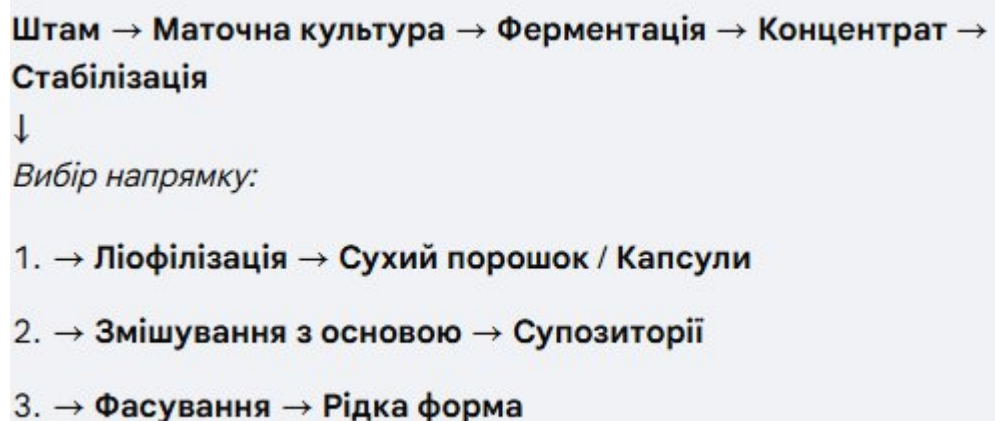


Рис. 1.1. Спрощена схема одержання кормового пробіотичного препарату [27].

Одержані пробіотичні препарати діють як імуномодулятори. Вони стимулюють активність макрофагів та збільшують рівень секреторного імуноглобуліну А (sIgA) у слизовій оболонці кишечника. Це створює «першу лінію оборони» проти патогенів. Також відзначено вплив на морфологію

кишечника: збільшення висоти ворсинок та глибини крипт, що безпосередньо корелює з кращим всмоктуванням амінокислот та мінералів.

Ключовим аспектом терапевтичної дії пробіотиків є їхня здатність виступати в ролі біологічних імуномодуляторів. Взаємодіючи з імунокомпетентними клітинами кишечника (М-клітинами, дендритними клітинами та макрофагами), пробіотичні штами ініціюють каскад сигнальних реакцій, що призводить до гармонізації імунної відповіді (рис.1.2).

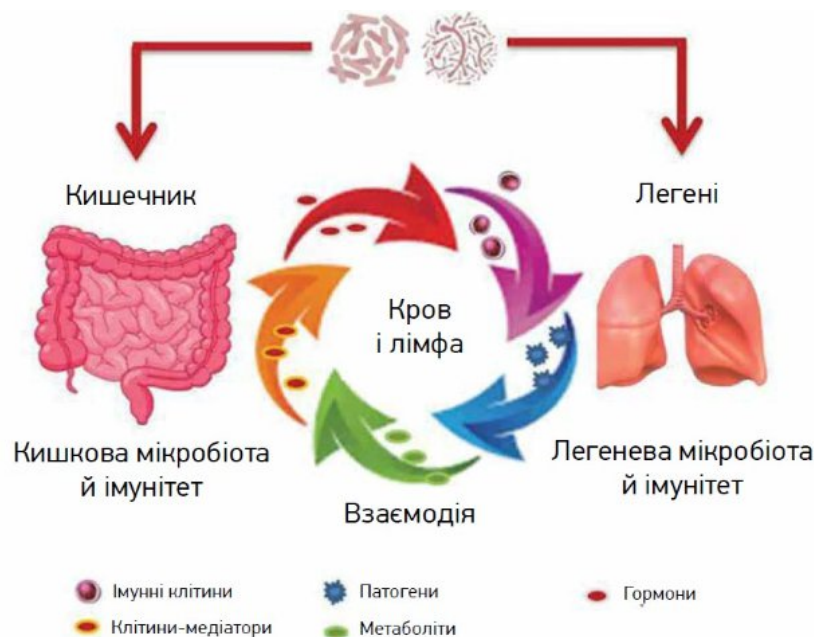


Рис. 1.2. Участь пробіотиків у профілактиці вірусних захворювань [32].

Пробіотики є потужними індукторами ендогенного інтерферону (IFN- α , IFN- β та особливо IFN- γ). Цей процес має критичне значення для противірусного захисту – інтерферони стимулюють синтез білків, що блокують реплікацію вірусів усередині клітин. IFN- γ активує природні кілери (NK-клітини) та цитотоксичні Т-лімфоцити, які розпізнають і знищують інфіковані та мутовані (онкогенні) клітини.

Через модуляцію цитокінів пробіотики забезпечують генетично чистоту популяцій клітин. Антипроліферативний ефект проявляється у гальмуванні неконтрольованого поділу клітин, що в поєднанні з активацією макрофагів створює надійний бар'єр проти новоутворень. Деякі штами здатні

знижувати рівень прозапальних цитокінів (таких як $\text{TNF-}\alpha$), що зменшує хронічне запалення – відомий тригер онкогенезу (рис. 1.3).

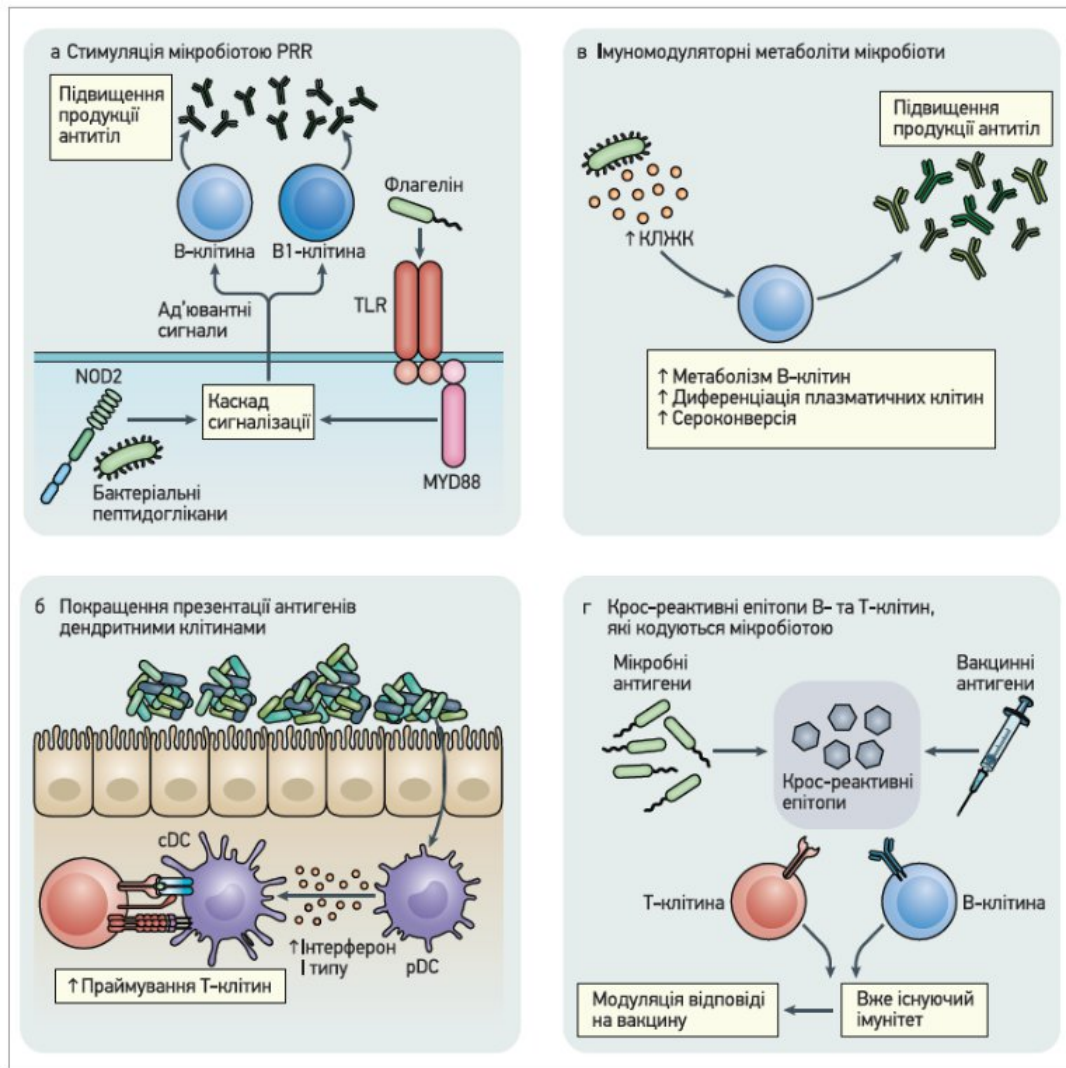


Рис. 1.3. Шляхи опосередкованого впливу симбіотичних мікроорганізмів на імунологічну реактивність організму та їхня здатність виступати природними ад'ювантами для вакцин [35].

Пробіотики не просто стимулюють імунітет, а виконують контрольно-регуляторну функцію через баланс Th1/Th2 . Вони допомагають підтримувати рівновагу між клітинною (Th1) та гуморальною (Th2) ланками імунітету, що є профілактикою алергічних та аутоімунних станів. Шляхом стимуляції інтерлейкіну-10 (IL-10) та трансформуючого фактора росту ($\text{TGF-}\beta$) пробіотики обмежують надмірні запальні реакції, запобігаючи пошкодженню власних тканин організму.

Стимуляція інтерферонів посилює фагоцитарну активність лейкоцитів. Це означає, що організм стає здатним швидше ідентифікувати та елімінувати патогенні бактерії ще до розвитку розгорнутої клінічної картини інфекції.

Таким чином, пробіотики перетворюють кишечник на «тренувальний полігон» для імунної системи, де через механізм цитокінової регуляції формується системна резистентність до вірусів, бактерій та пухлинних агентів.

Взаємодія пробіотиків з імунною системою відбувається на молекулярному рівні через спеціальні PRR-рецептори (Pattern Recognition Receptors), серед яких ключову роль відіграють TLR-рецептори (Toll-like receptors). Кожен клас пробіотичних бактерій активує певні типи рецепторів:

- TLR₂ – розпізнає пептидоглікани та ліпотейхоєві кислоти грампозитивних бактерій (лакто- та біфідобактерій). Це запускає каскад сигналів, що зміцнюють міжклітинні контакти епітелію, роблячи кишковий бар'єр непроникним для токсинів;
- TLR₉ – реагує на бактеріальну ДНК (CpG-мотиви). Саме цей шлях є критичним для стимуляції синтезу інтерферонів I типу та активації природних кілерів (NK-клітин).

Окрім рецепторного зв'язку, пробіотики виділяють метаболіти (бутират, пропіонат), які діють на G-білок-асоційовані рецептори (GPR41, GPR43). Це підсилює енергетичний обмін в імуноцитах та регулює кількість Т-регуляторних клітин, що запобігають алергічним реакціям.

Таким чином, пробіотики діють як «біокомп'ютери», які через систему TLR-рецепторів зчитують стан мікрооточення і перемикають імунну систему з режиму агресії (запалення) на режим ефективного нагляду (гомеостазу).

1.5. Світовий та вітчизняний досвід щодо нормативно-правового регулювання використання пробіотиків

Глобальний ринок кормових пробіотиків демонструє стабільне зростання (близько 7–9% щорічно), що зумовлено жорсткою політикою провідних країн щодо використання стимуляторів росту. Нормативно-правове регулювання кормових пробіотиків суттєво відрізняється від регулювання медичних препаратів, оскільки основний акцент зміщується з індивідуальної терапії на безпеку харчового ланцюга (від корму до столу) та екологічну стабільність [25].

Досвід Європейського Союзу (ЄС): ЄС є лідером у впровадженні «зелених» технологій у тваринництві. З 1 січня 2006 року Регламентом № 1831/2003 було повністю заборонено використання антибіотиків як кормових добавок. Це стимулювало розвиток сектора мікробних препаратів. У ЄС діє суворая система реєстрації через Європейське агентство з безпеки харчових продуктів (EFSA), де кожен штам пробіотика повинен отримати статус QPS (Qualified Presumption of Safety) – кваліфікована презумпція безпеки. Це означає повну відсутність генів антибіотикорезистентності у геномі штаму-продуцента.

Досвід США та Канади: У США регулюванням займається FDA (Food and Drug Administration). Тут поширена концепція GRAS (Generally Recognized as Safe). Американська модель більше орієнтована на прямий економічний ефект, тому велика увага приділяється поєднанню пробіотиків з органічними кислотами та ферментами для досягнення максимальних приростів [33].

Азійський вектор (Китай, В'єтнам): Через високу щільність поголів'я в цих країнах пробіотики розглядаються як стратегічний засіб біобезпеки для запобігання пандеміям (наприклад, африканській чумі свиней або пташиному грипу). Тут активно розвиваються технології ферментованих кормів, де пробіотики додаються безпосередньо у вологий корм на фермі.

Україна в межах гармонізації законодавства з ЄС прийняла Закон «Про ветеринарну медицину» та «Про безпечність та гігієну кормів», які поступово обмежують обіг антибіотиків. Це створює сприятливе «вікно можливостей» для вітчизняних біотехнологічних підприємств. Головним викликом залишається відсутність достатньої кількості акредитованих лабораторій, здатних проводити повноцінний генетичний аналіз штамів (NGS-секвенування) для підтвердження їхньої безпечності згідно з вимогами EFSA.

Україна активно реформує законодавство у сфері ветеринарної медицини, фактично копіюючи модель ЄС (табл. 1.8). Закон України «Про безпечність та гігієну кормів»: це основний документ, який гармонізований з європейськими регламентами. Він визначає процедуру реєстрації кормових добавок. Всі кормові пробіотики підлягають обов'язковій реєстрації у Державному реєстрі кормових добавок. Експертизу проводить Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ).

Таблиця 1.8

Відмінності у нормативному регулюванні щодо використання кормових пробіотиків в ЄС та Україні

Характеристика	Світ (ЄС/США)	Україна
Класифікація	Кормова добавка (Feed Additive)	Кормова добавка
Екологічний контроль	Обов'язкова оцінка впливу на довкілля	В процесі впровадження (згідно з новими законами)
Генетична карта	Обов'язкове повне секвенування геному	Обов'язкове для нових штамів
Маркування	Суворі заборона лікувальних заяв	Дозволено вказувати функціональну дію

В Україні, як і в ЄС, критичною вимогою є відсутність плазмідної резистентності до антибіотиків. Це перевіряється шляхом секвенування геному штаму-продуцента. Виробництво базується на державних стандартах

або технічних умовах, які регламентують кількість життєздатних клітин (КУО) на грам продукту та терміни їхнього виживання в складі комбікорму після термічної обробки (гранулювання).

Головні тренди регулювання [26]:

- боротьба з антибіотикорезистентністю. Заборона використання пробіотиків, що можуть бути джерелом генів стійкості до ліків.
- видова специфічність. Реєстрація штамів під конкретний вік та вид тварин (наприклад, престартерні корми для поросят).
- термостабільність. Регулювання методів мікроінкапсуляції, щоб бактерії витримували високі температури під час виготовлення гранульованих кормів.

Виробництво та застосування пробіотиків – це складний наукоємний процес, де технологічна досконалість (збереження життєздатності клітин) поєднується з глибоким біологічним впливом на організм через цитокінову регуляцію та TLR-рецептори. Сучасний світовий досвід свідчить про перехід до суворого нормативного контролю, де ключовим критерієм є не лише ефективність, а й генетична безпека штамів (відсутність антибіотикорезистентності). Для України стратегічним завданням залишається повна гармонізація законодавства з нормами ЄС, що дозволить вітчизняним препаратам бути конкурентоспроможними як у медицині, так й в аграрному секторі.

РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Опис стадій технологічного процесу одержання пробіотику кормового призначення

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва. Здійснюється згідно з принципами GMP, чинними СОП та технологічними інструкціями.

ДР 1.1. Підготовка персоналу. Проводиться відповідно до СОП щодо допуску та поведінки в приміщеннях. Персонал зобов'язаний дотримуватися правил перевдягання, гігієни рук та внутрішнього розпорядку. Контроль мікробної контамінації рук (метод змиву/відбитків) виконує лаборант: двічі на тиждень – під час роботи та раз на два тижні – після дезінфекції. Результати фіксуються у відповідному протоколі мікробіологічного контролю.

ДР 1.1.1. Кваліфікація та навчання персоналу. Компетентність: до роботи допускаються лише фахівці з відповідною освітою, навичками та досвідом, що дозволяють у повному обсязі виконувати посадові обов'язки. Нові працівники проходять навчання за планом (GMP, екологія, гігієна, санітарія, гарантія якості) та вивчають відповідні СОП та інструкції. З питань охорони праці, техніки безпеки та пожежної безпеки проводяться при прийнятті на роботу та щоквартально.

Персонал проходить перепідготовку не рідше рази на рік, а навчання правилам GMP є безперервним. Проводиться негайно у разі змін у техпроцесах, виявлення помилок або відхилень для аналізу причин та запобігання їх повторенню.

Регулярно, за графіком, проводяться навчання з операційних процесів, роботи в «чистих зонах», гігієни, прибирання та техніки безпеки. Через малий штат окремий підрозділ не створюється – за навчання персоналу відповідає призначений співробітник.

На кожного працівника ведеться картка обліку навчання, де фіксуються дані про внутрішнє та зовнішнє навчання, результати перевірки знань, дати, теми та підписи сторін. Окрім карток, записи про проведення інструктажів зберігаються у спеціальних журналах за кожним напрямком.

ДР 1.1.2. Медичний огляд працівників. Весь персонал проходить попередній (при прийнятті на роботу) та періодичні медичні огляди згідно із законодавством. Стан здоров'я, порядок оглядів та умови допуску до виробничих і складських зон визначаються внутрішніми СОП. Контроль за дотриманням встановлених вимог та своєчасністю оглядів покладено на керівників структурних підрозділів. Процедури оглядів та видача медичних книжок регулюються Постановою КМУ №559. За наявності показань (наприклад, після інфекційних хвороб) огляди проводяться частіше за встановлений графік. На кожного працівника ведеться медична картка, де фіксуються дати оглядів, діагнози, рекомендації та дані лікаря.

ДР 1.1.3. Санітарно-гігієнічне навчання та вимоги. На підприємстві діє комплексна програма санітарних заходів та СОП, що охоплюють гігієну персоналу, підготовку приміщень, обладнання та спецодягу. Кожен працівник зобов'язаний ознайомитися з програмою та суворо дотримуватися правил особистої гігієни (регулярний душ, чистота рук).

У виробничих зонах заборонено використовувати будь-яку декоративну косметику, лак для нігтів/волосся та парфумерію з інтенсивним запахом. При роботі в рукавичках їх необхідно обробляти 70% спиртом або 3% перекисом водню. Для запобігання резистентності мікроорганізмів дезінфікуючі розчини чергуються кожні 5–6 днів.

ДР 1.2. Приготування мийних та дезінфікуючих розчинів. Використовуються лише безпечні засоби, що не становлять загрози для продукту та споживача, забезпечуючи високий рівень санітарії. Перелік засобів для забезпечення асептики: «Біомой» – миття та до стерилізаційне очищення (сульфонол, лужна протеаза); «Гігієнізер» – дезінфекція (активна речовина – 30% перексид водню); «Дезактін» – хлорвмісний концентрат для

дезінфекції та очищення; 70% етиловий спирт – обробка поверхонь та рук; 3% пероксид водню – знезараження рук та пробовідбірників.

ДР 1.2.1. Приготування розчину «Біомой». Розчин готують у збірнику з мішалкою або в іншій промаркованій тарі (із зазначенням назви та дати). Засіб змішують із питною водою у заданій концентрації. Перемішують не менше 15 хвилин (швидкість – 40 об/хв). Свіжий розчин використовують протягом доби. Термін зберігання у щільно закритій тарі – до 14 діб. Після закінчення цього терміну розчин дозволено використовувати виключно для миття приміщень та підлоги.

ДР 1.2.2. Приготування розчину «Гігієнізер». Робочі розчини готують у діапазоні 0,5–5% на основі питної води. Змішування проводять у промаркованій тарі з мішалкою впродовж 15–20 хв (швидкість – 40 об/хв). Оптимальна температура води – від 10°C до 40°C. Максимальна біоцидна активність досягається при 40°C. Готовий розчин зберігають у герметичній тарі не довше 1 доби.

ДР 1.2.3. Приготування розчину «Дезактін». Використовується промаркована ємність із будь-якого матеріалу, крім оцинкованого заліза. Наважку засобу змішують із питною водою. Для швидкого розчинення можна використовувати гарячу воду (60±5°C). Перемішувати 20–25 хвилин при швидкості 40 об/хв. Терміни зберігання: для дезінфекції – до 3 діб у щільно закритій тарі; для до стерилізаційного очищення – до 14 діб.

ДР 1.2.4. Приготування розчину етилового спирту. Для приготування 1 л 70% розчину, у чистій промаркованій тарі змішують 729 мл 96% спирту та 271 мл дистильованої води. Ретельно перемішують протягом 2–5 хвилин при кімнатній температурі. Розчин зберігають у герметично закритій тарі не довше 1 місяця.

ДР 1.2.5 Приготування розчину пероксиду водню. Для приготування 1 л 3% розчину H_2O_2 змішайте 85,8 мл 35% концентрату та 914,2 мл води. Зберігайте розчин у маркованій непрозорій тарі в темному місці не довше 48 годин.

ДР 1.2.6. Приготування мийно-дезінфікуючих розчинів. У ємність із мішалкою дозують дезінфікуючий засіб («Гігієнізер» або «Дезактін») та мийний засіб «Біомой». Суміш перемішують 15–20 хв при швидкості 40 об/хв. Термін зберігання в закритій тарі – 5–6 діб.

ДР 1.3. Підготовка комплекту технологічного одягу. Персонал забезпечується 6 комплектами одягу. Склад комплекту визначається класом чистоти приміщення (згідно з табл. 2.1) та вимогами СТП.

Таблиця 2.1

Комплектація технологічного одягу у відповідності до класу приміщення

Клас чистоти приміщення	Комплектність технологічного одягу	Періодичність заміни
B	Комбінезон або брючний костюм, респіратор чи маска, носки, рукавички, тапочки	При кожному вході в чисте приміщення
C	Брючний костюм або халат, шапочка, маска, носки, рукавички, тапочки	Щоденно
D	Брючний костюм чи халат, шапочка, носки, тапочки	Кожні 2-3 доби

Апаратник контролює зміну, прання та стерилізацію одягу, фіксуючи його рух у журналі. Мікробіологічний контроль проводиться двічі на тиждень – вибірково у персоналу під час роботи (метод змивів). Раз на два тижні – одразу після стерилізації. Результати згідно з СОП вносяться до відповідного протоколу чистоти одягу та рук.

ДР 1.3.1. Попередній огляд одягу. Перед пранням одяг оглядають на цілісність, справність застібок та сортують за кольором. Дефектні речі ремонтують або замінюють. Підготовлений одяг у закритих контейнерах передають на прання, де безпосередньо перед процесом замочують у 0,5% розчині «Дезактіну» на 15 хв.

ДР 1.3.2. Прання спецодягу та миття рукавичок. Одяг перуть у машинах із синтетичним засобом (наприклад, ТОКО Есо) протягом 30 хв при температурі, що відповідає типу тканини. Прополіскують двічі теплою водою, один раз холодною та віджимають у центрифугі. Рукавички миють з

обох боків теплою водою з 70% господарським милом, після чого ополіскують очищеною водою та передають на сушку.

ДР 1.3.3. Сушіння одягу та рукавичок. Одяг сушать комплектно у шафах стерильним повітрям (через фільтр тонкої очистки) при температурі до 55°C. Рукавички: сушать при 65±5°C по 10–15 хв з кожного боку. Сухі комплекти та пари рукавичок загортають у два шари пергаменту (або безворсові мішки) і в закритих контейнерах передають на стерилізацію.

ДР 1.3.4. Стерилізація одягу та рукавичок. Вироби обробляють у парових стерилізаторах 45 хв (тиск 0,11 МПа, температура 120±1°C). Після цього їх підсушують та охолоджують стерильним повітрям. Термін зберігання стерильного одягу – до 2 діб.

ДР 1.3.5. Підготовка взуття. Вологу обробку проводять мінімум раз на тиждень. Процес включає: миття у розчині (0,5% мийного та 1% дезінфікуючого засобів); ополіскування очищеною водою; підсушування.

ДР 1.4. Підготовка приміщень. Підготовка забезпечує класи чистоти В, С та D (згідно з ГНД 07.006.98) через вологе прибирання та дезінфекцію поверхонь. Проводиться після завершення технологічного процесу або зміни. Інвентар має бути чітко промаркований за призначенням; зберігається у спеціальних приміщеннях. Після роботи прибиральниці матеріали замочують у 5% розчині дезінфектанту.

Лаборант двічі на тиждень вибірково контролює чистоту стін, вікон та підлоги методом змивів (згідно з СОП). Результати фіксують у протоколі. На двері прибраного приміщення вивішують етикетку «Чисто» із датою та підписом. Використані етикетки додають до протоколу підготовки виробництва.

ДР 1.4.1. Щоденне прибирання. Щоденну підготовку приміщень проводять вологим способом, використовуючи суміш 0,5% «Біомою» та дезінфектанту («Гігієнізер» або «Дезактін»). Концентрація дезінфектанту: 3% – для класів В і С; 1% – для класу D. При виявленні грибів концентрацію дезінфікуючого засобу підвищують до 4%, а спороутворюючої мікрофлори –

до 6%. Приміщення без категорії миють без дезінфекції. Стіни, двері та столи протирають безворсовими серветками, змоченими розчином (110–150 мл/м²). Після цього миють підлогу. Рідкі відходи прибирання знешкоджують згідно з етапом ЗВ 16.1.

ДР 1.4.2. Генеральне прибирання. Проводиться кожні 5–6 днів шляхом розпилення (гідропультом або генератором туману) мийно-дезінфікуючого розчину в розрахунку 150–200 мл/м², приміщення закривають на 20–30 хв, залишки розчину збирають губками або серветками; сильні забруднення миють додатково. Використані розчини та води знешкоджують на стадії ЗВ 16.1.

ДР 1.5. Підготовка обладнання та комунікацій. Обладнання та комунікації готують перед кожним новим технологічним процесом. Процедура включає миття, дезінфекцію поверхонь та стерилізацію окремих вузлів. Роботи виконуються в спеціальному одязі та ЗІЗОД (респіраторях). Перед використанням матеріали для чищення знезаражують у 3% розчині дезінфектанту.

Перед обробкою обладнання знеструмлюють, а пил і бруд видаляють механічно (щітками, серветками). Лаборант здійснює мікробіологічний контроль (метод змивів) згідно з СОП: двічі на тиждень – під час роботи; раз на два тижні – одразу після дезінфекції чи стерилізації. Результати фіксують у протоколі.

ДР 1.5.1. Миття та дезінфекція обладнання та комунікацій. Знімні вузли розбирають і миють у 0,15% розчині «Біомою» (до 60°C), після чого двічі ополіскують очищеною водою. Внутрішні поверхні обробляють сумішшю 0,3% «Біомою» та 3% дезінфектанту (до 40°C). Ополіскують двічі очищеною водою та фінально – водою для ін'єкцій. За потреби протирають 70% етиловим спиртом. Ротація дезінфектантів – кожні 6–10 днів, загальна дезінфекція – двічі на рік. Усі розчини та змиви знешкоджують на стадії ЗВ 16.1.

ДР 1.5.2. Перевірка на герметичність та технічний огляд. Фахівець перевіряє стан обладнання на відповідність вимогам безпеки, фіксуючи результат підписом у журналі нагляду. Герметичність ємностей досліджується повітряним тиском 0,05–0,06 МПа. Апаратура герметична, якщо за 30 хв тиск упав не більше ніж на 0,005 МПа. З'єднання та ущільнення перевіряють мильним розчином під тиском 0,5 МПа. При виявленні витоків проводять ущільнення. Усі вентилі та трубопроводи (матеріальні, посівні, конденсатні) перевіряють під паровим тиском, усуваючи пропуски.

ДР 1.5.3. Стерилізація обладнання та комунікацій. Стерилізацію проводять гострою парою під тиском 0,18–0,20 МПа та температурі 125–130°C протягом 1 години. Пара подається на всі вузли та вентилі, пов'язані зі стерильною зоною. Відлік часу починається з моменту досягнення заданих параметрів.

ДР 1.6. Підготовка виробничого посуду та інвентарю. Весь скляний, металевий (ємності) та лабораторний посуд (пробірки, чашки Петрі, піпетки тощо) підлягає обов'язковому очищенню та дезінфекції для запобігання мікробній контамінації продукту.

ДР 1.6.1. Миття посуду та інвентарю. Залишки біомаси чи середовищ видаляють щіткою у контейнери для відходів. Миття та знежирення проводять у машинах або ваннах із мийними засобами. Очищений вручну інвентар миють повторно у розчині двічі меншої концентрації (від 40°C). Ополіскування проводять двічі очищеною водою та дистильованою водою. Наприкінці дня посуд обробляють 0,15% «Гігієнізером» (експозиція 10 хв), після чого промивають очищеною водою. Посуд протирають 70% спиртом та обпалюють полум'ям

ДР 1.6.2. Сушіння посуду та інвентарю. Сушіння проводять на повітрі або в сушильних шафах (швидший метод) при температурі 100–120°C із піддуванням повітря.

ДР 1.6.3. Стерилізація посуду. Металевий, порцеляновий та скляний посуд стерилізують сухим жаром у сушильних шафах. Режими стерилізації: за температури 150°C – 2 години; при 160-170°C – 1 або 1,5 години (найбільш оптимальний режим); при 180°C – 30 хв.

ДР 2. Підготовка повітря. Заходи з очищення атмосферного повітря від пилу та бактерій для вентиляції та створення надлишкового тиску в апаратах.

ДР 2.1. Підготовка вентиляційного повітря. Ступені очистки: 2-ступенева – для класу D; 3-ступенева – для класів B і C. Повітрообмін: клас B (20–40 кратний), клас C (10 кратний). Швидкість витяжки біля підлоги – 0,4–0,8 м/с. Контроль чистоти: двічі на тиждень – бактеріологічний контроль (седиментаційний метод); регулярний контроль вмісту механічних часток в 1 м³.

ДР 2.2.2. Перший ступінь очистки. Попереднє очищення повітря від механічних часток і пилу розміром понад 5 мкм. Повітря нагнітається вентилятором під тиском 0,2 МПа крізь масляні регенеруючий фільтр (наприклад, типу ФЯР). Синтетичні волокна або металева сітка, оброблені мінеральною олією. Ефективність – затримують 92–99% пилових часток.

ДР 2.2.3. Стабілізація показників повітря. Очищене повітря охолоджують у теплообміннику до температури 20±2°C при вологості 45±5%.

ДР 2.2.4. Другий ступінь очистки повітря. Повітря нагнітається вентилятором через фільтри (ефективність 95%) для видалення бактеріальної аерозолі та часток розміром від 1,5 мкм: клас D – використовуються фільтри типу «Лайк» (тканина ФПП-15); класи B і C – використовуються фільтри типу ФР5 перед повітророзподільником.

ДР 2.2.5. Третій ступінь очистки повітря. Забезпечує фінальне очищення для класів B і C (ефективність 99,995%): фільтри. Типу «Лайк» із гідрофобного перхлорвінілового волокна затримують частки розміром до 0,5 мкм, за температури не вище 60°C.

ДР 2.2. Підготовка технологічного повітря. Стерильне повітря отримують шляхом фільтрації та осушення. Воно використовується для створення надлишкового тиску в апаратах (аерація в технології не застосовується).

ДР 2.2.1. Забір атмосферного повітря. Повітря забирають через шахту на висоті 20–30 м. Вихідні параметри: температура 18–20°C, вологість 60–70%, вміст часток – 2000 шт/м³.

ДР 2.2.2. Попередня очистка. Повітря очищують від пилу та вологи у фільтрах періодичної дії з можливістю регенерації. Ефективність: 80%.

ДР 2.2.3. Стискання повітря. Очищене повітря стискають у турбокомпресорі до тиску 0,35 МПа. Температура при цьому зростає до 90–100°C.

ДР 2.2.4. Стабілізація показників. Стиснене повітря охолоджують у теплообміннику до робочої температури 37±1°C. Вологість підтримується в межах 40–60%.

ДР 2.2.5. Очищення на головному фільтрі. Повітря проходить крізь фільтр із порами 1 мкм (ефективність 95%). Заміна матеріалу – планово двічі на рік; позапланово – у разі зростання опору (забруднення) або інфікування фільтра.

ДР 2.2.6. Фільтр індивідуальної очистки. Фінальний етап видалення часток розміром 1,5 мкм (ефективність 99,999%). Використовується фільтр типу ФТО з тканиною Петрянова ФПП-11-1,5.

ДР 3. Підготовка води. Для поживних середовищ та розчинів, що контактують із культурою, використовують воду очищену та воду для ін'єкцій, які отримують шляхом багатоетапної обробки питної води.

ДР 3.1. Підготовка води очищеної. Воду очищену отримують на спеціальній установці та подають трубопроводами. Контроль згідно з СОП: щодня проводять хімічний аналіз (опис, рН, електропровідність, Са, Mg) та аналіз на мікробіологічну чистоту, кислотність, лужність, вміст нітратів,

важких металів, хлоридів, сульфатів, солей амонію, діоксиду вуглецю та заліза – один раз на тиждень.

ДР 3.1.1. Підігрів і термостатування. Питну воду подають у теплообмінник, де через сорочку з гарячою водою підтримується стабільна температура 20°C.

ДР 3.1.2. Груба фільтрація. Вода (20°C) подається насосом на фільтри з гранульованим завантаженням (наприклад, піщаним) із чистотою очищення від часток 80–100 мкм. Контроль справності перевіряють за різницею тиску на вході та виході.

ДР 3.1.3. Пом'якшення води. Процес видалення іонів Mg^{2+} та Ca^{2+} та іонів Na^{+} відбувається шляхом іонного обміну на автоматичному пом'якшувачі, вимірювання жорсткості води проводять на вході та виході.

ДР 3.1.4. Фільтрація через вугільний фільтр. Вода проходить крізь патронні фільтри з активованим вугіллям, що видаляють 60–70% хлору та органіки. Щоквартально проводять перевірку вугілля фільтру на вміст хлору.

ДР 3.1.5. Зворотний осмос. Фінальне очищення від солей та органіки через напівпроникні мембрани (пори 0,0005–0,001 мкм) під тиском, вищим за осмотичний. Контроль здійснюється шляхом вимірювання електропровідності води на виході. Концентрат домішок направляється на знешкодження. Очищену воду зберігають у закритих ємностях з інертних матеріалів, що гарантують стабільність її фізико-хімічних та мікробіологічних показників згідно з діючими нормами.

ДР 3.2. Підготовка та контроль води для ін'єкцій (ВДІ). ВДІ готують на спецвстанові та подають трубопроводами. Контроль згідно з СОП проводять шляхом вимірювання рН, електропровідність, окиснюваність. Щотижня досліджують кислотність, лужність, нітрати, важкі метали, хлориди, сульфати, амоній, діоксиду вуглецю та заліза. Двічі на місяць – пірогенність, щомісяця – мікробіологічну чистоту.

ДР 3.2.1. Деіонізація. Процес повного обезсолення води шляхом видалення заряджених часток через шари катіонообмінної та аніонообмінної

смол. Справність деіонізатора перевіряють за показником питомої електропровідності на виході.

ДР 3.2.2. Дистиляція. Воду очищують у багатокорпусних установках шляхом багаторазового випаровування та конденсації. Дистилят охолоджують і зберігають у закритих інертних ємностях, захищених від мікробного та механічного забруднення.

ДР 4. Підготовка робочих розчинів. У виробництві використовують: глюкозу та лактозу – для підживлення середовища; амоніак та гідроксид натрію – для регулювання pH; ізотонічний розчин NaCl (0,9%) – для взяття мікробіологічних змивів та відновлення музейних культур.

ДР 4.1. Приготування розчину глюкози. Для отримання 34 л 40% розчину змішайте 13,6 кг глюкози та 30,1 л ВДІ (температурою 60-70°C) шляхом змішування 20 хв при 50 об/хв. Стерилізація проходить за температури 112°C впродовж 30 хв. Готовий розчин розливається по чотирьох скляних балонах об'ємом 10 л.

ДР 4.2. Приготування розчину лактози. Наважку 13,2 кг лактози розчиняють у 29,2 л ВДІ при гомогенізації 50 об/хв. Готовий розчин стерилізується при температурі 110°C впродовж 20 хв. Отриманий розчин охолоджується та розливається по балонах об'ємом 10 л.

ДР 4.3. Приготування розчину аміаку. Для отримання 5% робочого розчину змішують 25% концентрат аміаку з ВДІ. Зберігають у скляних балонах або ємностях із нержавіючої сталі.

ДР 4.4. Приготування розчину NaOH. Для 20% розчину розчиняють 20 г сухого натру в 980 мл очищеної води, перемішують 10–15 хв та стерилізують за 131°C протягом 30 хв.

ДР 4.5. Приготування розчину ізотонічного NaCl. Розчиняють 9 г солі в 1 л очищеної води до повного розчинення. Стерилізація відбувається в автоклаві при 100°C протягом 30 хв.

ДР 5. Підготовка пакувальної тари. Для захисту препарату від вологи, кисню та світла обрано багатошарові пакети (фольга + поліпропілен). Перед

використанням партію оглядають на цілісність та відповідність вимогам постачальника.

ДР 6. Підготовка поживних середовищ. Проводиться в приміщеннях класу чистоти В.

ДР 6.1. Підготовка контрольних середовищ. Мікробіологічний контроль здійснюється на всіх етапах: Поживний агар – для визначення загального мікробного числа (ЗМЧ); Середовище Кода – для виявлення бактерій групи кишкової палички (БГКП) у змивах; середовище Кесслера – для виявлення БГКП у напівпродуктах та готовому пробіотику. Також проводиться контроль на наявність *Proteus*, *Salmonella* та інших патогенів.

ДР 6.1.1. Підготовка поживного агару. До 1 л очищеної води додають $35\pm 0,01$ г сухого середовища. Суміш кип'ятять на водяній бані 2–3 хв до розплавлення, фільтрують гарячою та стерилізують при $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ (20 хв). Розлив проводять у чашки Петрі при $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$, підсушування в асептичних умовах при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 50 ± 10 хв.

ДР 6.1.2. Підготовка середовища КОДА. Наважку $40\pm 0,01$ г розчиняють у 1 л води, кип'ятять 2–3 хв до розчинення та фільтрують гарячою. Фільтрат повторно доводять до кипіння. Фасування проводять по 5 мл у стерильні пробірки (готове середовище має бути зеленого кольору).

ДР 6.1.3. Підготовка середовища Кесслера. Наважку $16\pm 0,01$ г сухого середовища змішують з 1 л очищеної води та кип'ятять 25 ± 5 хв. Після відновлення об'єму водою та фільтрації розчин розливають у пробірки (по 5 мл) та колби (по 50 мл). Стерилізація відбувається в автоклаві при $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 10 ± 1 хв.

ДР 6.2. Підготовка виробничого поживного середовища. Склад середовища (згідно з табл. 2.2) розділено на дві композиції через різну стійкість компонентів до нагрівання (термостабільні та термолабільні), що потребує окремих режимів стерилізації.

ДР 6.2.1. Підготовка термостабільних компонентів (Композиція Б). Компоненти зважують (точність 0,01 г) та завантажують у колби, посівний

апарат або ферментер для змішування. Стерилізація відбувається у колбах в автоклаві та в апаратах – парюю через сорочку («на місці»), за температури 131°C протягом 30 хв.

Таблиця 2.2

Склад та кількість компонентів поживного середовища [26]

Компоненти	Вміст	Композиція
Аскрбінова кислота	0,1 мг	А Термолабільні компоненти
Гідролізат знежиреного молока	30,0 г	
Глюкоза	20,0 г	
Дріжджовий екстракт	5,0 мл	
Кукурудзяний екстракт	10,0 мл	
Лактоза	10,0 мл	
Твін-80	0,3 г	
Трі-сол	10,0 г	
ФІЗ	10,0 г	
4-водний сульфат мангагу	0,2 г	Б Термостабільні компоненти
7-водний сульфат заліза (ІІІ)	0,1 мг	
7-водний сульфат магнію	0,2 г	
Ацетат натрію тригідрат	5,0 г	
Цитрат натрію	5,0 г	
Вода для ін'єкцій	до 1 л	
рН до стерилізації	7,0	
рН після стерилізації	6,4	

ДР 6.2.2. Підготовка термолабільних компонентів (Композиція А). До стерильної композиції Б додають компоненти композиції А та ретельно перемішують. Стерилізація проводиться аналогічно (в автоклаві або безпосередньо в апаратах), за температури 112°C протягом 40 хв.

ДР 7. Підготовка захисного середовища. Склад: 5% сухого знежиреного молока, 10% сахарози, 5% желатину. Оптимальна кислотність – 6,8 рН.

ДР 7.1. Відновлення сухого молока. Наважку 29,394 кг розділяють на чотири ємності (по 7,348 кг у кожну). У кожну місткість додають по 15 л ВДІ та ретельно перемішують до однорідності. Відновлені розчини передають на змішування з іншими компонентами.

ДР 7.2. Приготування та стерилізація розчину желатину. Для приготування 120 л розчину у збірник (180 л) завантажують 30 кг желатину та 91 л ВДІ. Після набрякання при кімнатній температурі желатин розплавляють при температурі 50-60°C (через сорочку апарата). Розчин фільтрують у збірник (250 л), додають 60 л ВДІ та перемішують. Стерилізують близько 2 год при температурі $132\pm 2^\circ\text{C}$ та тиску 0,2 МПа. Процедуру обов'язково повторюють через 18–20 годин. Теплий стерильний розчин подають у збірник (800 л) для змішування з біомасою.

ДР 7.3. Приготування розчину сахарози. Змішують 58,788 кг цукру та 80 л ВДІ за температури 60-80°C та перемішують при швидкості 60 об/хв механічним перемішуючим пристроєм. Отримані 120 л розчину профільтруйте через сито та передайте на змішування з біомасою.

ДР 7.4. Змішування компонентів захисного середовища. У збірник на 800 л подайте 120 л розчину сахарози, 120 л розчину желатину та відновлене сухе молоко (з 4-х балонів). Перемішування проходить із ретельною гомогенізацією при 40 об/хв. Стерилізують за температури $110\pm 2^\circ\text{C}$ впродовж 30 хв та при тиску 0,05 МПа.

ТП 8. Отримання посівного матеріалу. Процес включає три етапи: відновлення музейних культур; отримання I та II генерацій маточних культур. Штами, які використовували як посівний матеріал: *B. infantis* 4302, *B. longum* 4600, *L. paracasei* 3801, *L. plantarum* 3204.

ТП 8.1. Відновлення музейних культур. Флакони з ліофілізатом (по 2 на штам) обробляють 70% спиртом із дотриманням асептичних умов. У кожен флакон вносять 5 мл ізотонічного розчину NaCl та ретельно перемішують. Суспензію кожного штаму висівають петлею у 10 пробірок із поживним агаром. Пробірки витримують у термостаті при $37\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 24 годин.

ТП 8.2. Отримання маточної культури I генерації. Використовують 10 колб (3 л), кожна з яких містить 550 мл стерильного середовища. У кожену колбу за асептичних умов переносять по 4 відновлені культури (по одній

кожного штаму). Колби закривають ватно-марлевими пробками. Інкубація проходила у термостаті при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ впродовж 24 годин. Вміст колб перемішують 2–3 рази для рівномірного розподілу клітин та запобігання осаду. Частину суспензії передають у лабораторію для перевірки фенотипових ознак. Невикористаний біоматеріал знешкоджують.

ТП 8.3. Отримання маточної культури II генерації. У 120-літровий інокулятор із 76 л стерильного середовища вносять 6,190 л маточної культури I генерації (коефіцієнт заповнення – 0,7). Температура культивування – $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (через сорочку апарата), час культивування – 48 годин із перемішуванням 2–3 рази на добу (70 об/хв) для гомогенізації, з контролем рН на рівні $6,4\pm 0,1$ за допомогою 5% розчину амоніаку. Готовність підтверджують візуально за наявності каламутності та білого осаду. Напівпродукт передають на виробниче культивування.

ТП 9. Виробниче культивування. Процес проводять у приміщенні класу чистоти В відповідно до діючої технологічної інструкції з культивування штамів у промисловому ферментері.

ТП 9.1. Отримання виробничої культури. У ферментер об'ємом $2,5\text{ м}^3$ із стерильним середовищем завантажують 84 л маточної культури II генерації (доза – 6%, коефіцієнт заповнення – 0,7). Завантаження проводять вакуумним способом через стерильний сифон і силіконовий шланг. Параметри культивування (згідно з інструкцією): температура – $37\pm 1^{\circ}\text{C}$; рН в межах $6,4\pm 0,1$ од.; надлишковий тиск – 0,3 МПа; перемішування – постійне, швидкість 70 об/хв; тривалість культивування – 14 ± 1 годин. Рівень рідини відстежується автоматичним сигналізатором. Для аналізу чистоти та оптичної густини відбирають 200–300 мл проби. Після відбору штуцер і шланг знезаражують у 3% розчині

ТП 9.2. Підживлення культури. На 5–6 годині ферментації до культури додають 40% розчини глюкози та лактози (отримані на етапах ДР 4.1 та 4.2). Внесення розчинів здійснюється за асептичних умов через силіконовий шланг шляхом створення вакууму у ферментері.

ТП 9.3. Охолодження культуральної рідини. Після завершення культивування біомасу охолоджують до 10–12°C, подаючи холодну воду в сорочку ферментера.

ТП 10. Відділення біомаси. Процес проводять у приміщенні класу чистоти В методом центрифугування для видалення супернатанту за «м'яких» умов (3000 об/хв, тривалість – 20 хв) для збереження життєздатності клітин. Після центрифугування біомасу перевіряють на стерильність та кількість ККУ (живих клітин). Параметри та результати контролю фіксують у протоколі серії.

ТП 11. Стабілізація виділеної біомаси. Процес проводять у приміщенні класу чистоти В у реакторі на 800 л, де вже підготовлене захисне середовище. Біомасу та захисне середовище поєднують у співвідношенні 1:2, гомогенізацію проводять при 100 об/хв протягом 15–20 хв, корекцію рН здійснюють 5% розчином амоніаку. Через донний сифон відбирають проби для визначення титру живих бактерій (ББ та МКБ) та перевірки на відсутність сторонньої мікрофлори. Дані вносять у протокол виготовлення серії.

ТП 12. Розлив рідкого напівпродукту по касетах. Процес проводиться у приміщенні класу чистоти В за допомогою стерильного дозатора. Металеві касети обробляють 3% розчином перекису водню та обпалюють у полум'ї. Стабілізовану біомасу подають із реактора на дозатор через сифонні трубки. Дозатор працює на стислому повітрі. Для запобігання осаду мішалку реактора періодично вмикають на 5 хв. Заповнені касети накривають кришками та переміщують «чистим» коридором до ліофільної сушарки. На початку та в кінці розливу відбирають проби на відсутність контамінації (посів на агар, 24 год при 37±1°C). Ріст має бути відсутнім. Дані заносять у технологічний протокол.

ТП 13. Ліофілізаційне висушування. Процес проводиться у приміщенні класу чистоти С у камерній вакуум-сушильній установці з попередньою глибоким заморожуванням.

ТП 13.1 Заморожування культури. Сушильну камеру охолоджують до -40°C рідким аміаком. Касети з біомасою (без кришок) завантажують на полиці та заморожують 5 годин до -47°C , після чого витримують ще 11 годин при -40°C .

ТП 13.2 Висушування біоматеріалу. Перевіряють герметичність камери, вмикають вакуум-насос і подають амоніак у конденсатор. При $-45\ldots-60^{\circ}\text{C}$ відкривають засувку та створюють тиск 50–70 Па. Після 3 годин сублімації амоніак замінюють на глізантин і вмикають нагрів. Температуру полиць поступово підвищують (на $2\text{--}4^{\circ}\text{C}/\text{год}$) до $+34\ldots+36^{\circ}\text{C}$. Загальна тривалість етапу – 10 годин.

ТП 13.3 Десорбція біомаси. При $+34\ldots+36^{\circ}\text{C}$ біомасу довисушують протягом 5 годин. Потім закривають засувку конденсатора, вимикають вакуум-насос і подають у камеру стерильне повітря для вирівнювання тиску до атмосферного.

ТП 14 Подрібнення та фасування готового продукту. Процес проводять у приміщенні класу С при вологості $\leq 70\%$. Ліофілізовану біомасу подрібнюють у валковій дробарці, що забезпечує рівномірний помел без переподрібнення. Продукт фасують у багатошарові полімерні пакети по 1 кг. Допустиме відхилення маси – до 1%. Готовий продукт стандартизують згідно з ТУ.

ПМВ 15 Пакування, маркування та відвантаження готового продукту. Вакуумізацію проводять у приміщенні класу С (спільно з подрібненням та фасуванням). Маркування та пакування у транспортну тару здійснюють у некласифікованих приміщеннях.

ПМВ 15.1 Вакуумізація продукту в пакетах. Вакуумізація забезпечує герметичність та збереження властивостей продукту. Пакет фіксують на затискачі, після чого апарат автоматично відкачує повітря та запаює край. Тривалість циклу – близько 30 секунд.

ПМВ 15.2 Маркування пакувальних пакетів. Пакети маркують вручну готовими етикетками. Обов'язкові дані: назва («ТІММ-С»), тип (пробіотична

кормова добавка), склад, умови зберігання (0–40°C), застосування, власник посвідчення, ТУ, реквізити виробника, номер серії, дата виготовлення, термін придатності та маса нетто (1 кг).

ПМВ 15.3 Пакування в транспортну тару. Продукт вручну пакують у гофрокартонні ящики відповідно до об'єму замовлення. У кожен тару обов'язково додають лист-вкладиш з інструкцією. Транспортування можливе поштовими службами. Готову продукцію переміщують на склад.

ЗВ 16 Знешкодження відходів. Неповне використання сировини та матеріалів зумовлює утворення твердих і рідких промислових відходів. Залишки та дефектні матеріали підлягають утилізації з мінімізацією шкідливого впливу на довкілля.

ЗВ 16.1 Знешкодження рідких відходів. Некондиційні матеріали та фугат знезаражують в автоклаві (130–132°C, 40–45 хв), розбавляють водою до окиснюваності 450–700 мг/л, нейтралізують рН і зливають у каналізацію. Розчини дезінфектантів, мийних засобів, амоніаку та солей також нейтралізують і зливають. Промивні води перед скиданням перевіряють на відповідність санітарно-гігієнічним нормам.

ЗВ 16.2 Знешкодження твердих відходів. Тверді некондиційні відходи збирають у спеціальні бокси та вивозять на полігони ТПВ. Фільтрувальні елементи, що не підлягають регенерації, попередньо нейтралізують та утилізують.

ПВ 17 Переробка відходів. Макулатуру, картон та чисту тканину передають на вторинну переробку. Умовно чисту воду (тепло/холодоносію) перевіряють на відповідність ДСанПіН 2.2.4-171-10 для повторного використання. У разі невідповідності воду доочищують на стадії ДР 3 або утилізують (ЗВ 16). Деякі фільтри підлягають регенерації та дезінфекції для повторного застосування.

2.2. Матеріал і методи дослідження

Для досягнення поставленої мети та оцінки якості пробіотичного кормового препарату на основі *Bacillus subtilis* використовується комплекс мікробіологічних та біотехнологічних методів.

Об'єктом дослідження є штам бактерій *Bacillus subtilis*. Для його культивування у лабораторних умовах використовували стандартне м'ясо-пептонне середовище (МПА для щільних середовищ, МПБ для рідких) або оптимізоване середовище з додаванням меляси (4%) та кукурудзяного екстракту (2%).

Визначення концентрації мікроорганізмів проводили методом серійних розведень. Дослідження кількості життєздатних клітин (визначення КУО) базується на здатності однієї живої клітини розмножуватися на поживній основі з утворенням колоній. Відповідно до вимог ДФУ та GMP, основні етапи методики наступні:

1. Підготовка зразка та розведення. Якщо очікується висока концентрація мікробів, роблять серійні десятикратні розведення (1:10, 1:100 і т.д.) у стерильному розчиннику (наприклад, 0,9% NaCl або фосфатний буфер). Це потрібно, щоб на чашці виросло від 10 до 300 колоній – таку кількість зручно і точно рахувати [28].

2. Основні методи посіву. Вибір методу залежить від типу продукту та вимог вашого СТП: глибинний посів – 1 мл досліджуваного розчину вносять у порожню стерильну чашку Петрі та заливають розплавленим (до 45°C) агаром, перемішують коловими рухами; поверхневий посів (Метод Коха) – 0,1 мл розчину наносять на поверхню вже застиглому агару та рівномірно розподіляють шпателем; метод мембранної фільтрації – певний об'єм продукту пропускають через фільтр, який затримує бактерії. Потім фільтр кладуть на поверхню агару.

3. Інкубація (вирощування). Чашки ставлять у термостат при певній температурі: для бактерій (ТАМС) – 30–35°C протягом 3–5 діб; для грибів та дріжджів (ТУМС) – 20–25 °C протягом 5–7 діб.

4. Підрахунок та розрахунок результату. Після закінчення терміну рахують кількість колоній на чашці. Формула розрахунку:

$$N = C \times D/V$$

, де:

N – кількість КУО в 1 г або 1 мл.

C – кількість підрахованих колоній.

D – коефіцієнт розведення (наприклад, 100).

V – об'єм проби, внесений у чашку.

Оцінка антагоністичної активності (Метод дифузії в агар). Цей метод дозволяє перевірити, наскільки ефективно пробіотик пригнічує патогени (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*). На поверхню агару засівають «газоном» культуру патогену. Стерильним пробійником роблять лунки діаметром 6 мм, у які вносять суспензію *Bacillus subtilis*. Після інкубації вимірюють зону затримки росту патогену навколо лунки. Зона понад 15–20 мм свідчить про високу антибактеріальну активність штаму [29].

Визначення інтенсивності спороутворення. Оскільки життєздатність препарату залежить від наявності спор, проводиться мікроскопічний контроль. Готують мазок культури та фарбують за методом Пешкова або Ожешко. Під світловим мікроскопом (збільшення x1000, імерсія) визначають співвідношення вегетативних клітин (сині) та спор (червоні/рожеві). Високий рівень споруляції (понад 80%) є індикатором готовності культури до висушування.

Методи оцінки ефективності у тваринництві (*in vivo*). Для перевірки дії препарату на тваринах (на прикладі поросят) використовують наступні показники: зоотехнічні – зважування тварин кожні 10 днів для розрахунку середньодобових приросту; гематологічні – аналіз крові на вміст гемоглобіну, загального білка та імуноглобулінів (для оцінки

імуномодуючого ефекту); мікробіологічні – посів фекалій для аналізу змін у складі кишкової мікрофлори (збільшення кількості лакто- та біфідобактерій на фоні зниження ентеробактерій) [30].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Скринінг антагоністичної активності штамів *Bacillus subtilis*

У ході лабораторних досліджень було проведено порівняльний аналіз здатності штаму *Bacillus subtilis* BS-22 пригнічувати ріст умовно-патогенних мікроорганізмів. Штам *Bacillus subtilis* BS-22 (сінна паличка) є одним із найбільш вивчених та безпечних мікроорганізмів, які широко використовуються у промисловій мікробіології, виробництві ферментів та пробіотиків.

Здатність пригнічувати ріст або повністю знищувати патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми є наслідком індивідуальних властивостей штаму *Bacillus subtilis* BS-22, а саме:

- синтез антибіотичних речовин: *B. Subtilis* виробляє понад 70 видів антибіотиків (наприклад, субтилін, бацитрацин, поліміксин). Вони руйнують клітинні мембрани патогенів або блокують їхній синтез білка;
- продукування ферментів: штам активно синтезує хітинази та глюканазу, які розчиняють клітинні стінки грибів (фунгіцидна дія). Протеази руйнують білкові токсини, що виділяють хвороботворні бактерії;
- конкуренція за субстрат: бацила росте швидше за більшість патогенів, буквально «захоплюючи» територію та поживні речовини, витісняючи конкурентів;
- зміна рН середовища: в процесі життєдіяльності штам може підкислювати середовище, що робить його непридатним для життя гнільних бактерій [33].

У науковій лабораторії кафедри біотехнології та радіології за стандартами GMP досліджували антагоністичну здатність штаму *Bacillus subtilis* BS-22 на ріст патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Для цього використовували метод лунок (дифузія в агар). У шарі агару з патогеном роблять лунку, куди заливають культуральну рідину штаму BS-22.

Вимірюють зону затримки росту (в мм), коли зона > 20 мм – висока активність, а коли зона 10–20 мм – середня активність (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Антагоністична активність досліджуваного штаму (*Bacillus subtilis* BS-22)

(n=3)

Тест-культура патогенних мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм	Рівень чутливості
<i>Escherichia coli</i>	20,5 ± 1,2	Високий
<i>Salmonella typhimurium</i>	21,4 ± 0,8	Високий
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,2 ± 1,5	Середній
<i>Candida albicans</i> (гриби)	12,0 ± 0,5	Помірний

Найвищу антагоністичну активність штаму *Bacillus subtilis* BS-22) виявив щодо грамнегативних бактерій, зокрема *Salmonella* та *E. coli*. Завдяки здатності пригнічувати ріст цих патогенів та перешкоджати їх адгезії до слизової оболонки кишківнику, цей штаму є перспективним кандидатом для розробки препаратів для профілактики та комплексної терапії гострих кишкових інфекцій.

На відміну від традиційних антибіотиків, які мають бактерицидну дію, але часто викликають дисбактеріоз (порушення балансу мікрофлори в організмі тварин, при якому зменшується кількість корисних бактерій і розмножуються шкідливі або умовно-патогенні мікроорганізми), цей штаму діє комплексно: він не лише пригнічує патогени через виділення органічних кислот та бактеріоцинів, а й сприяє відновленню власної мікрофлори та зміцненню кишкового бар'єра.

Це робить його перспективним для профілактики кишкових інфекцій, особливо в ситуаціях, де тривале застосування антибіотиків є небажаним через ризик розвитку резистентності (табл. 3.2). У той час як антибіотики є незамінними для лікування гострих станів, пробіотичний штаму виступає як засіб безпечної профілактики, оскільки він не створює «біологічної пустелі»

в кишківнику, а м'яко витісняє *E. Coli* та *Salmonella*, зберігаючи здоров'я організму.

Таблиця 3.2

Порівняльні відмінності між використанням традиційних антибіотиків та пробіотичного штаму в боротьбі з кишковими інфекціями

Характеристика	Антибіотики (широкого спектра)	Досліджуваний пробіотичний штам
Механізм дії	Пряме знищення бактерій (бактерицидна) або зупинка їх росту.	Конкурентне витіснення патогенів, виділення бактеріоцинів та органічних кислот.
Вибірковість	Низька: знищують як патогени (<i>Salmonella</i>), так і корисну мікрофлору.	Висока: пригнічує патогени, підтримуючи та відновлюючи баланс власної мікрофлори.
Ефект на імунітет	Може тимчасово пригнічувати імунну відповідь.	Стимулює місцевий імунітет кишківника (синтез IgA).
Ризик резистентності	Високий ризик появи стійких штамів супербактерій.	Відсутній; бактерії не виробляють стійкість до біологічних факторів штаму.
Вплив на слизову	Можливе подразнення та пошкодження ворсинок кишківника.	Зміцнює бар'єрну функцію та покращує регенерацію епітелію.
Побічні ефекти	Дисбактеріоз, діарея, кандидоз, алергічні реакції.	Практично відсутні (можлива індивідуальна адаптація).
Тривалість застосування	Суворо обмежена курсом (5–10 днів).	Може використовуватися тривало для профілактики та підтримки.

3.1.1. Оптимізація параметрів культивування для максимального виходу спор *B. subtilis*

Досліджували вплив джерела вуглецю на інтенсивність спороутворення. Встановлено, що використання меляси бурякової у концентрації 5% забезпечує не лише високий титр клітин ($5,8 \times 10^9$ КУО/мл), але й пришвидшує процес споруляції на 12 годин порівняно із використанням 2% глюкози (табл. 3.3). Це дозволяє знизити енерговитрати на аерацію біореактора.

Таблиця 3.3

Порівняльна кінетика росту та спороутворення залежно від джерела
Карбону в поживному середовищі біореактора

Параметр порівняння	Глюкоза (чиста, 2%)	Меляса бурякова (5%)	Технологічний ефект
Максимальний титр клітин	$1,2 \times 10^9$ КУО/мл	$5,8 \times 10^9$ КУО/мл	Збільшення виходу біомаси у ~5 разів.
Час до початку споруляції	36–42 години	24–28 годин	Скорочення лаг-фази та фази росту.
Загальний час циклу	60–72 години	48–60 годин	Економія 12 годин робочого часу.
Рівень споруляції (%)	65–70%	92–95%	Висока гомогенність та стабільність препарату.
Зміна рН середовища	Стрімке закислення (<5.5)	Стабільне (буферна дія)	Менші витрати на титранти для корекції рН

Дослідження джерел Карбону як базового субстрату для ферментації показали значну перевагу 5% меляси над 2% чистої, без домішок глюкози, це насамперед залежить від складу субстрату. Склад меляси як чинник інтенсифікації: сахароза (45-50%) – джерело енергії, що засвоюється м'якше за глюкозу; бетаїн – осмопротектор, захищає клітини від стресу під час росту; марганець (Mn^{2+}) – прямий активатор ферментів споруляції (Spo0A); амінокислоти – готовий будівельний матеріал для білків оболонки спори;

вітаміни (В₁, В₂, В₆) – Коферменти метаболізму, що пришвидшують поділ клітин.

Таблиця 3.4

Економічні та енергетичні показники технологічного процесу
спороутворення залежно від джерела Карбону

Показник витрат	Глюкоза (2%)	Меляса (5%)	Різниця / Вигода
Вартість субстрату	Висока (реактив)	Низька (відхід цукру)	Зниження витрат на сировину в 4-6 разів.
Енерговитрати на аерацію	100% (база)	~80%	Економія 20% електроенергії на цикл.
Знос обладнання	Стандартний	Знижений	Менше годин роботи двигунів та компресорів.
Вихід готового продукту	Середній	Максимальний	Вища рентабельність кожної ферментації.

Перехід на 5% мелясу дозволяє отримати кондиційну суспензію спор за 48 годин замість 60, що при промисловому виробництві дає змогу проводити на 1-2 цикли ферментації більше щомісяця.

Таблиця 3.5

Розрахунок інтенсивності аерації за стадіями технологічного процесу
(для робочого об'єму біореактора 100 л)

Стадія культивування	Тривалість (год)	Рекомендований vvm	Потік повітря (л/хв)	Мета режиму
Лаг-фаза (адаптація)	0- 4	0.5	50	Мінімальне перемішування.
Експоненціальна фаза (ріст)	4-18	1.0-1.2	100-120	Максимальна потреба в О ₂
Стаціонарна фаза (початок споруляції)	18-36	0.8	80	Підтримка енергії синтезу спор.
Дозрівання спор	36- 48	0.4-0.6	40- 60	Економічний режим перед збором.

Для оптимізації роботи біореактора важливо правильно розрахувати показник vvm (volume of air per volume of liquid per minute) – відношення об'єму повітря, що подається за хвилину, до робочого об'єму рідини (табл. 3.5). Використання 5% меляси дещо підвищує в'язкість середовища порівняно з глюкозою, що вимагає інтенсивної, але контрольованої аерації для підтримки розчиненого кисню (pO_2) на рівні 20–40% від насичення.

Розрахунок сумарної економії повітря. Завдяки скороченню циклу на 12 годин (з 60 до 48 год), основна економія припадає на фінальну стадію, де зазвичай витрачається значна кількість енергії на роботу компресора.

Приклад для біореактора на 1000 л (1 м^3): Середня інтенсивність аерації: $0.8\text{ vvm} = 800\text{ л повітря/хв}$ ($48\text{ м}^3/\text{год}$). Час економії: 12 годин. Об'єм збереженого повітря: $48\text{ м}^3 \times 12 = 576\text{ м}^3$ стисненого повітря на один цикл ферментації.

Таблиця 3.6

Вплив аерації на якість спор у середовищі з мелясою

Рівень аерації	Вплив на <i>B. subtilis</i>	Результат
Низький ($<0.4\text{ vvm}$)	Перехід на анаеробне дихання (бродиння).	Накопичення токсинів, низький титр.
Оптимальний ($0.8\text{--}1.0\text{ vvm}$)	Активний метаболізм сахарози та бетаїну.	Синхронна споруляція за 48 год.
Надмірний ($>1.5\text{ vvm}$)	Окислювальний стрес, механічне пошкодження клітин піною.	Передчасний лізис (руйнування) клітин.

Оскільки меляса схильна до піноутворення при інтенсивній аерації (1.2 vvm), обов'язковим є використання автоматичного дозатора піногасника (наприклад, силіконового типу) або механічних піногасників на валу мішалки.

3.1.2. Вплив пробіотичного препарату розробленого на основі штаму

B. subtilis на продуктивні якості поросят

Однією із важливих особливостей приготування пробіотичних кормових препаратів є дотримання усіх технологічних регламентів (гранулювання, екструзія, механічний вплив та оптимальний термін зберігання) без шкоди живій культурі. Оскільки процеси гранулювання та екструзії відбуваються за підвищеної температури, нами, досліджувалась термостабільність штамів *Bacillus subtilis* (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Показники термостабільності штаму *Bacillus subtilis*

Температура, °C	Час впливу	Рівень виживання (%)	Технологічний процес
+80°C	20 хв	~91%	Тривале прогрівання/гранулювання
+85°C	10 хв	~89–90%	Стандартне гранулювання
+90°C	5-10 хв	~85–89%	Високотемпературне гранулювання
+95°C	2 хв	~80–85%	Інтенсивна термообробка
+100°C	<1 хв	~75–80%	Екструзія (короткочасна)
+110°C	<30 сек	Початок загибелі (>50%)	Межа критичної стійкості

Як видно із даних вище наведеної табл. 3.7 штами *Bacillus subtilis* володіють високою термостабільністю. А тому виробництво кормових пробіотиків на основі *Bacillus subtilis* є їхньою головною технологічною перевагою. На відміну від лактобактерій, цей мікроорганізм перебуває у формі спори, що робить його надзвичайно стійким до агресивних зовнішніх факторів. Це дозволяє препарату витримувати критичні режими гранулювання та екструзії без суттєвої втрати життєздатності.

Спори легко витримують стандартні режими гранулювання при температурах +85...90°C. Короткочасний вплив високої температури та вологи не руйнує оболонку спори. Навіть при короткочасних піках до +100...110°C в процесі екструзії (за умови високого тиску та низької

вологості) рівень виживання бактерій залишається високим (в межах 80-90% від початкового титру). Механічний вплив, який проявляється при змішуванні та подрібненні компонентів корму, спори не пошкоджуються через міцну багатошарову структуру, що гарантує його рівномірний розподіл по всій масі корму.

По завершенню технологічного процесу приготування концентрованого корму пробіотичний його компонент зберігає активність впродовж 6–12 місяців, не вимагаючи спеціальних температурних умов. Після потрапляння в кишечник тварини спори «прокидаються» і починають діяти.

Для перевірки біологічної ефективності кормового пробіотичного препарату, створеного на базі штаму *Bacillus subtilis* BS-22 було сформовано дві групи поросят (по 15 голів у кожній). Дослідна група отримувала кормовий пробіотик у дозі 1 г/кг корму впродовж 30 днів (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

Показники приросту живої маси та збереженості поголів'я поросят під впливом кормової пробіотичної добавки

Показник	Контрольна група	Дослідна група	Різниця, %
Жива маса на початку, кг	6,2 ± 0,3	6,1 ± 0,4	-
Жива маса через 30 днів, кг	15,6 ± 0,7	17,9 ± 0,5	+12,9%
Середньодобовий приріст, г	312	394	+20,8%
Збереженість поголів'я, %	86,6%	93,3%	+6,7%

Застосування кормового пробіотичного препарату, створеного на базі штаму *Bacillus subtilis* BS-22 дозволило підвищити інтенсивність росту тварин майже на 20,8% із збереженість поголів'я 93,3%, що перевищувало контрольні показники на 6,7%. Особливо важливо, що в дослідній групі

випадки діареї спостерігалися вдвічі рідше, що підтверджує лікувально-профілактичну дію препарату.

Розрахунок показав, що на кожну витрачену гривню на закупівлю/виробництво пробіотичного кормового препарату господарство отримує 4,2 грн додаткового прибутку за рахунок збереженості молодняка та економії кормів за рахунок покращення їх конверсії.

Для виявлення імуномодуючого ефекту кормового пробіотичного препарату було проведено аналіз крові піддослідних поросят на 30-й день експерименту (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Гематологічні показники піддослідних поросят ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Контрольна група	Дослідна група	Норма
Еритроцити, Т/л	$5,8 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,3$	5,0–8,0
Гемоглобін, г/л	$102,4 \pm 5,1$	$114,8 \pm 4,2^*$	90–120
Загальний білок, г/л	$58,2 \pm 2,4$	$64,5 \pm 1,8^*$	55–75
Гамма-глобуліни, %	$14,2 \pm 0,9$	$18,6 \pm 1,1^*$	13–19

$*p < 0,05$ відносно контролю

Підвищення рівня гамма-глобулінів на 31% у дослідній групі вказує на активацію гуморальної ланки імунітету. Збільшення вмісту загального білка свідчить про інтенсифікацію пластичного обміну та краще засвоєння амінокислот корму під впливом ферментів *B. subtilis*.

Аналіз калових мас показав, що в групі, яка отримувала пробіотичний кормовий препарат, кількість лактобактерій зросла на 1,2 lg КУО/г, тоді як кількість ентеробактерій (включаючи потенційно патогенні ешерихії) знизилася на 0,9 lg КУО/г. Це підтверджує антагоністичний ефект *Bacillus subtilis* до патогенів та синергізм для корисної мікрофлори кишечника.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено огляд наукової літератури та актуальних онлайн-джерел щодо розробки й впровадження про-, пре- та синбіотиків. Проаналізовано сучасний стан вітчизняного та світового ринків фармацевтичних біопрепаратів, а також систематизовано дані про видовий склад мікроорганізмів, що використовуються як продуценти.

2. У ході виконання кваліфікаційної роботи було проведено комплексне дослідження біотехнологічних аспектів виробництва та застосування пробіотичних препаратів у тваринництві.

3. Обґрунтовано актуальність переходу від антибіотичних стимуляторів росту до мікробних препаратів. Встановлено, що використання пробіотиків є стратегічним напрямком для подолання проблеми антибіотикорезистентності та отримання екологічно безпечної продукції тваринництва.

4. Доведено переваги штамів *Bacillus subtilis* як основи для біопрепаратів. Завдяки здатності до спороутворення, ці мікроорганізми забезпечують високу технологічну стійкість препарату (термостабільність при гранулюванні кормів) та виживання у шлунково-кишковому тракті тварин.

5. Встановлено, що використання поживних середовищ на основі м'яси (5%) та кукурудзяного екстракту забезпечує максимальний титр життєздатних спор (не менше $5,8 \times 10^9$ КУО/мл) при скороченні циклу ферментації.

6. Досліджений штам продемонстрував виражену здатність пригнічувати ріст небезпечних патогенів, зокрема *Salmonella typhimurium* (зона затримки росту 21,4 мм) та *Escherichia coli* (20,5 мм).

7. Використання кормового пробіотика у раціон молодняка свиней дозволило збільшити середньодобові прирости на 20,8% та підвищити збереженість поголів'я на 6,7% порівняно з контрольною групою.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Шульга С. М. Пробіотики: біотехнологічні аспекти отримання та застосування в тваринництві. *Мікробіологічний журнал*. 2021. № 3. С. 77–89.
2. Закон України «Про ветеринарну медицину» (редакція від 2024 р.) щодо обмеження використання антибіотиків у тваринництві: від 14.02.2024 р. № 3500-IX. URL: <https://zakon.rada.gov.ua>
4. Спиридонов В. Г., Каплуненко В. Г. Нанотехнології у виробництві мікробних препаратів для ветеринарної медицини. *Біотехнологія*. 2022. Т. 15, № 2. С. 45–58.
5. Макаренко А. О. Використання спороутворювальних бактерій роду *Bacillus* у годівлі сільськогосподарських тварин. *Науковий вісник ЛНУВМБ*. 2023. Т. 25, № 102. С. 12–19.
6. Біотехнологія: підручник/ В. Г. Герасименко та ін.; за ред. В. Г. Герасименка. 4-те вид. Х.: Еней, 2021. 648 с.
7. Hassan A., et al. *Bacillus subtilis* as a viable alternative to antibiotics in poultry feed: A review. *Journal of Applied Microbiology*. 2024. Vol. 135, Issue 2.
8. Грищенко В. А. Роль мікробіоти кишечника у формуванні імунітету тварин. *Ветеринарна медицина України*. 2024. № 1. С. 5–11.
9. Похил С. І. та ін. Сучасні пробіотики: класифікація, механізми дії, перспективи розробки V покоління. *Аннали Мечниковського інституту*. 2023. № 4. С. 18–25.
10. Патент України № 148921. Спосіб стабілізації пробіотичного препарату методом мікрокапсулювання / [Автори]. Опубл. 12.05.2021, Бюл. № 19.
11. Інструкція про застосування препарату «Субалін» ветеринарний. Реєстраційне посвідчення № 2335/105. Державний реєстр ветеринарних препаратів України. К., 2024.

12. Акименко Л. І. Стандартизація розробки, виготовлення та контролювання якості пробіотичного препарату для тварин / Л. І. Акименко // XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського : тези доп., Одеса, 11–15 верес. 2017 р. Львів, 2017. С. 168.
13. Перспективи використання пробіотичних мікроорганізмів в функціональних продуктах харчування та медицині/С. О. Старовойтова, О. В. Карпов // Харчова промисловість. 2015. № 18. С. 76-80.
14. Коцюмбас І.Я. Пробиотики – необхідна складова при сучасних технологіях вирощування тварин / І.Я. Коцюмбас, М.І. Жила, М.І. Шкіль // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2013. Т. 15, № 3 (57). Ч. 2. С. 174–181.
15. FAO/WHO.Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food.*Technical Report*. Geneva, 2022. 54 p.
16. Пробиотики в годівлі тварин і птиці / С. О. Вовк [та ін.] // Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. 2021. № 69. С. 157–168.
17. Осадча Г. Г. Допоміжні виробництва та альтернативні методи розподілу їх витрат [Електронний ресурс] / Г. Г. Осадча, О. М. Рощина // Науковий вісник Міжнародного гуманітарного університету. 2016. № 21. С. 157–160. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nvmgu_eim_2016_21_35
18. Algburi A., et al. Control of Biofilm Formation by Probiotic Bacteria and Their Antimicrobial Compounds. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. Article 615.
19. Кушнір І. М., Семен І. С., Майба У. З. Вивчення біологічних властивостей пробіотичних штамів мікроорганізмів. Наук.-техн. бюл. ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Ін-т біології тварин. 2015. Вип. 16. № 2. С. 207-212.
20. Cartman S. T., et al. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 2024. Vol. 90, Issue 1. [DOI: 10.1128/aem.00456-23].

21. Markowiak P., Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Animal Health. *Animals (Basel)*. 2018. Vol. 8, Issue 6. P. 75.
22. Гармашева І. Л., Коваленко Н. К., Підгорський В. С., Лівійська О. П., та ін. Взаємодія клітин штаму *Lactobacillus plantarum* 337Д УКМ В-2627 з глинистими мінералами *in vitro*. Мікробіол. журн. 2016. № 4, Т. 78. С. 11-24.
23. Черепанський, В. В. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил / В. В. Черепанський, Н. М. Грегірчак // Наукові праці Національного університету харчових технологій. 2020. Т. 26, № 3. С. 45-59.
24. Suez J., et al. Next-generation probiotics: from basic research to clinical trials. *Nature Medicine*. 2022. Vol. 28. P. 224–239.
25. Малина В. В., Бондаренко Л. В., Лясота В. П., Гришко В. А. Перспективи застосування пробіотичних та ферментних препаратів у свинарстві : монографія. Біла Церква: БНАУ, 2017. 243 с.
26. Три в одному. Журнал The Ukrainian Farmer. 2019. №9 (117). [Електронний ресурс] / Режим доступу: URL:<https://agrotimes.ua/article/try-v-odnomu/>
27. Кишечна мікрофлора: вплив на неї пробіотиків та пребіотиків / [В.М. Рудіченко, М.О. Одинець, І.І. Тодорашко, В.В. Черватюк] // Фармакотерапія. 2014. № 9 (185). С. 32–35.
28. Калініченко С.В. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків / С.В. Калініченко, О.О. Коротких, І. Ю. Тіщенко // Український біофармацевтичний журнал. 2016. № 1 (42). С. 4–9.
29. Wang Y., et al. *Bacillus subtilis* as a robust tool for professional enzyme production. *Biotechnology Journal*. 2021. Vol. 16, Issue 4
30. Патент України №145230. Спосіб отримання спорового пробіотика для годівлі тварин. Опубл. 2022.
31. ДСТУ 7094:2009 Корми для тварин. Методи визначення кількості мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів. К.: Держспоживстандарт України, 2010. 15 с.

32. Юлевич О.І., Лихач А.В., Дехтя Ю.Ф. Ефективність використання пробіотиків у годівлі помісних поросят на дорощуванні// Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Ґжицького, 2017, т 19, № 74. С. 91-94.
33. ДСТУ 4500:2025 Препарати мікробні. Вимоги до виробництва, маркування та контролю якості. К.: Держспоживстандарт України, 2025. 22 с.
34. EFSA Panel on Additives. Safety and efficacy of *Bacillus subtilis* for all animal species. *EFSA Journal*. 2024. Vol. 22, Issue 3.
35. Śliżewska K. Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium [Електронний ресурс] / Katarzyna Śliżewska, Agnieszka Chlebicz-Wójcik // Biology. 2020. V. 9, № 12. P. 423.

ДОДАТКИ

Додаток А

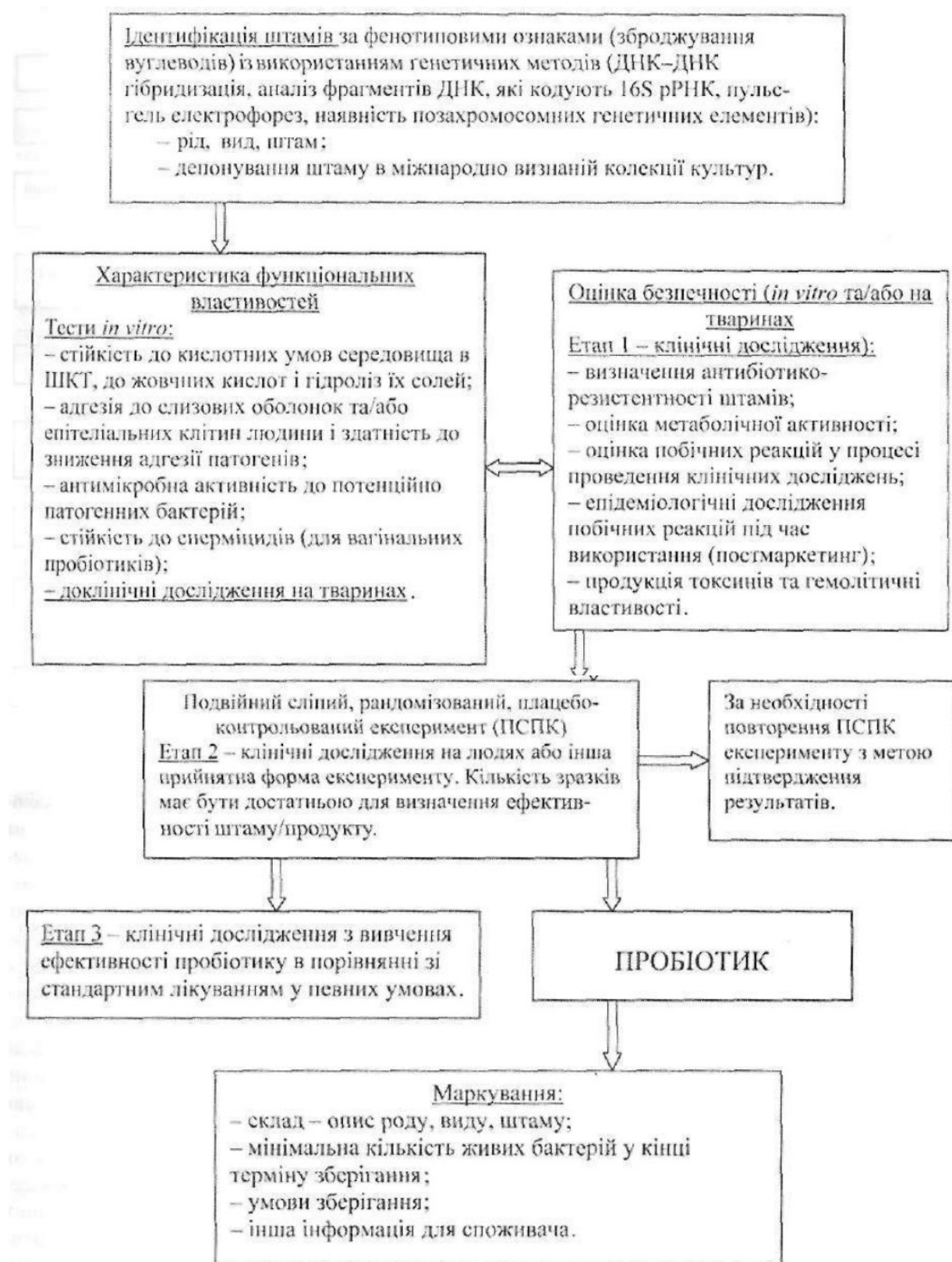


Рис. Етапи оцінки пробіотичних штамів.

Головні положення	Походження/Ідентифікація/Характеристика.
	Безпечність властивостей штаму і роду.
Безпечність	Активність і життєздатність у складі продукту, адгезивність, інвазивний потенціал.
	Стійкість до низького рН, шлункового соку, жовчних кислот, панкреатичного соку, колонізація/виживання <i>in vivo</i> .
Функціональні та фізіологічні положення	Адгезія до кишкового епітелію/тканин/вірулентність
	та/або
	Адгезія до патогенів Антимікробна активність
	та/або
	Стимуляція/пригнічення імунної відповіді
	та/або
	Селективна стимуляція корисних бактерій і пригнічення шкідливих бактерій
	та/або
	Клінічні дослідження на волонтерах/пацієнтах.

Рис. Підхід до оцінки безпечності пробіотичного штаму, запропонований Salminen et al.