

ВПЛИВ ПРОБІОТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *AEROCOCCUS VIRIDANS* ШТАМ VI-07 НА МОРФОЛОГІЮ ІМУННОЇ СИСТЕМИ КУРЧАТ-БРОЙЛЕРІВ

І. А. Бібен, канд. вет. наук, доцент

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет,
вул. Ворошилова, 25, м. Дніпропетровськ, 49100, Україна

*Однією з основних причин зниження життєздатності молодняку, збільшення захворюваності інфекційної та неінфекційної етіології й летальності, є низький рівень функціональної ефективності імунобіологічної реактивності, обумовлений інтенсивними технологіями експлуатації фізіологічних ресурсів організму на тлі виснажливих стресів середовища існування. Для збільшення життєздатності молодняку сільськогосподарської птиці з лікувально-профілактичною метою застосовують біологічно активні речовини. Найбільш екологічно коректними і фізіологічно ефективними є пробіотики. Заміна антибіотиків пробіотиками найважливіше завдання ветеринарної та гуманної медицини, для підвищення екологічної продукції птахівництва та споживчої якості. Нами була ізольована пробіотична культура *Aerococcus viridans* штаму VI-07 від здорових курчат-бройлерів на інтенсивній відгодівлі, вивчені її морфо-тинкторіальні, культуральні, біохімічні, біологічні властивості та встановлено яскраво виражений позитивний вплив на імуноморфогенез імунокомпетентних органів макроорганізму.*

Ключові слова: ІМУНОБІОЛОГІЧНА РЕАКТИВНІСТЬ, КУРЧАТА-БРОЙЛЕРИ, ПРОБІОТИКИ, БІОБЕЗПЕКА, МОРФО-ТИНКТОРІАЛЬНІ, КУЛЬТУРАЛЬНІ, БІОХІМІЧНІ, БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, *AEROCOCCUS VIRIDANS*/

Одним із головних завдань ветеринарної медицини в області птахівництва є підвищення екологічної безпеки кінцевої продукції галузі. Проблема боротьби з інфектопатогенами фізіологічно коректними методами у промисловому птахівництві стоїть особливо гостро. Одним з найбільш ефективних й екологічно чистих способів підвищення біобезпеки та підвищення споживчої якості продукції птахівництва є застосування пробіотичних біопрепаратів [1-7].

Відомо, що дисбіози у молодняку найчастіше розвиваються після непрофесійної антибіотикотерапії або масової профілактичної корекції фізіологічного стану, що підсилює колонізуючу потенцію патогенної та умовно-патогенної мікрофлори. Унаслідок негативного селективного впливу антимікробних препаратів на високочутливу до них резидентну мікробіоту локальної екоценотичної спільноти кишечника, пробіотичні культури часто застосовують з кормом для повторного заселення нормофлори кишечника дисбіотичних особин [1-3, 8-10].

Найбільш виражений вплив пробіотичні біопрепарати чинять на неонатальних тварин, що пов'язано з мікробіальною незаселеністю порожнин і тканин новонароджених тварин й подальшою бурхливою колонізацією кишечника мікрофлорою, нерідко агресивною та патогенною, в той момент, коли склад мікробіоценозів ще не сформований, а імунний захист, локальний й загальний, слабко диференційований та недостатньо коммітірований. Статевозрілі тварини менш чутливі до колонізації кишковими патогенами, ніж молодняк, так як у них більш стабільна і різноманітна кишкова флора, яка конкурентно перешкоджає сторонньої колонізації [2, 3, 6, 8, 9, 11].

Використання пробіотиків дає можливість прискорити ріст і розвиток молодняку і зменшити його відхід, при цьому пробіотики можуть застосовуватися замість кормових антибіотиків з першої доби життя неонатальних особин з метою стимуляції росту й розвитку та конкурентної протидії бактопатогенам. Як фізіологічного замітника антибіотиків пробіотичні біопрепарати не тільки не поступаються за антимікробною активністю, а й переважають за функціональною ефективністю, так як не чинять шкідливого впливу на мікробіоту кишечника [1-3, 12, 13].

Застосування пробіотиків ослабленим тваринам попереджає розвиток феномена транслокації умовно-патогенної мікрофлори з кишкової трубки в органи і тканини. Особливістю імунної системи курчат-бройлерів, що знаходяться на інтенсивній відгодівлі, є те, що вони знаходяться в стадії формування і початкового розвитку, що визначає своєрідність реагування на антигенну стимуляцію та стрес-фактори зовнішнього й внутрішнього середовища макроорганізму. Також пробіотики здатні підвищувати імунобіологічну резистентність макроорганізму, що особливо важливо в критичні періоди онтогенезу й виснажливим впливом внутрішніх й зовнішніх факторів при стресі організму, що призводить до вкрай негативних наслідків для росту й розвитку в процесі життєдіяльності. Тому застосування пробіотичних біопрепаратів є перспективним напрямком імунокорекції та стимуляції фізіологічних функцій організму [2, 4, 6-8, 9-11].

Завдання роботи - проведення імунорфологічного дослідження змін, які відбуваються в організмі курчат-бройлерів під впливом пробіотичної культури *Aerococcus viridans* штам *BI-07* у центральних (тимус, Bursa Fabricii) та периферичних (селезінка) органах імунної системи.

Матеріали і методи. Бактеріологічні та імунорфологічні дослідження виконані в НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського ДАЕУ.

Бактеріальну культуру *Aerococcus viridans* штам *BI-07* вирощували на елективному живильному середовищі оригінального складу: у 1000 см³ дистильованої води розчиняли 20 г сухого поживного агару та 15 г розчинного крохмалю. Суміш доводили до кипіння та додавали 400 мг йодистого калію, 30 мг грамуріну, 2 мг етонію. Суміш кип'ятили 20 хв й розливали в стерильні чашки Петрі й зберігали в холодильнику 20-30 діб. Культура *Aerococcus viridans* штам *BI-07* росла у вигляді не пігментованих колоній, діаметром до 1 мм. При обробці посівів розчином 10 % сірчаної кислоти (2,5 см³ на одну чашку Петрі) навколо колоній аерококів з'являвся темно-фіолетовий ореол. Ідентифікацію культур аерококів проводили за методом Б. Еванс [1986]. Підтитровку культури в суспензії проводили посівом послідовних десятикратних розведень бульйоном культури в обсязі 0,1 см³ в 4 пеніцилінових флакончиках, що містять по 1,0 см³ МПБ на ОПХ.

Результат враховували в альтернативній формі - бульйон мутний або прозорий. Кількість пеніцилінових флакончиків з позитивними і негативними результатами росту бульйонної культури виражали у вигляді десяткових логарифмів.

Накопичення збудника визначали за методом Спірмена-Кербера у викладі І.П. Ашмаріна [1962] стосовно процедури титрування бактерій та виражали кількісно в НЙЧ (найбільш ймовірне число). Розрахунок проводили за формулою:

$$\lg Pt = LGD + D \times (\sum Li + 0,5).$$

Для вивчення гістологічної структури органів дослідних й контрольних курчат-бройлерів, проводили їх забій (відсікання голови) і розтин.

Проби внутрішніх органів: тимуса, бурси Фабриціуса, селезінки відбирали розміром 5 × 5 × 1,5 см. Фіксацію біоматеріалу проводили в 10 % водному розчині нейтрального формальдегіду упродовж трьох діб. Фіксовані шматочки органів зневоднювали, обробляли хлороформом, заливали в парафін й наклеювали на дерев'яні колодки. З парафінових блоків на санному мікромомі готували парафінові зрізи та приклеювали на предметне скло. Після видалення залишків парафіну зрізи просвітлювали за допомогою карбол-ксилолу та

обробляли бальзамом. Препарати фарбували гематоксилін-еозином. Мікроскопію проводили на мікроскопі МБІ-6.

Результати й обговорення. Об'єктивним і коректним методом індикації морфо-фізіологічних змін, що відбуваються в організмі під впливом зовнішнього середовища на клітинно-тканинному рівні є гістологічне дослідження лімфоїдної тканини імунної системи.

Для вивчення впливу пробіотичної культури *Aerococcus viridans* штам ВІ-07 на імунологічну реактивність організму курчат провели дослід з порівняльного вивчення загальних показників двох груп курчат. Контрольну групу утримували й вирощували за загальноприйнятими екстенсивними методами з активним використанням антибіотиків, у дослідній групі повністю відмовилися від антибіотиків та ввели підгодівлю пробіотичною культурою аерококів - ізолюваної нами раніше від здорових курчат-бройлерів.

Для експериментального вивчення в умовах виробництва впливу пробіотика на життєздатність й імунореактивність організму курчат-бройлерів за принципом пар-аналогів методом випадкового неповторного відбору сформувавши дві рандомізовані групи курчат-бройлерів по 200 голів у кожній.

Основним фактором зовнішнього середовища, що впливав на біологічні функції макроорганізму в дослідній групі, це наявність в раціоні пробіотичної культури *Aerococcus viridans* штам ВІ-07 за відсутності антибіотиків. Контрольна група у порівнянні містилася за традиційною офіційною технологією з включенням у раціон антибіотиків у загальноприйнятих в системі забезпечення виживання комерційного поголів'я за традиційною технологією.

Дослідна й контрольна птиця містилася в ідентичних умовах у клітинних батареях КБУ-3. Технологічні параметри годівлі та утримання курчат-бройлерів відповідали рекомендаціям. Кожен експеримент тривав упродовж інтенсивного періоду відгодівлі технологічного циклу вирощування – 21 добу.

Курчатам дослідної групи пробіотичний препарат (бульйонну культуру *Aerococcus viridans* штам ВІ-07) щодня вводили груповим методом у сухий комбікорм, у вигляді культуральної рідини з накопиченням аерококів у діапазоні 9,0-9,5 LG / см³ НВЧ або 1,0-5,0 × 10⁹ ж.м.к. / см³. Протягом першого тижня дача пробіотика становила 1,0 см³ на голову, протягом другої - 2,0 см³, у наступний час одноразова превентивна доза бацилярної культури доходила до 3,0 см³ на голову.

Курчата контрольної групи в період вирощування отримували антибактеріальні препарати «Колівет», «Енрофлон», «Стрептоміцин», «Амоксиклав», «Норсульфазол», «Віркон-С» за технологічною схемою, прийнятою в господарстві у лікувально-профілактичних дозах, рекомендованими виробником.

За гістологічного дослідження тимуса у дослідних курчат 3-тижневого віку (21 доба) відмічається загальна тенденція рівномірного розвитку з добре сформованими часточками. Необхідно відзначити чіткий розподіл на коркову та мозкову зони, при цьому коркова речовина переважає над мозковою.

Епітеліальні клітини мозкової зони тимуса знаходяться на різній стадії дозрівання і відмирання, що свідчить про нормальний фізіологічний процес і вказує на активізацію процесів, що відбуваються в імунній системі. Тільця Гассаля добре розвинені, чітко окреслені. У них проглядаються процеси фізіологічного відмирання клітин. Кровоносні судини помірно кровонаповненні, периваскулярно можна бачити поодинокі плазматичні клітини. Сполучна тканина містить жирові дольки.

У тимусі курчат контрольної групи виявлені ознаки алергізації, які виражалися в еозинофільноклітинній інфільтрації, переважно мозкової та в деяких випадках коркової зони тимуса. Також було яскраво виражено витончення коркового шару, він був більш вузький і щільний та складався з щільно розташованих Т-лімфоцитів. Мозкова зона сильно розширена, інфільтрована лейкоцитами та псевдоеозинофілами. Тільця Гассаля різко позначені, із

значною кількістю лейкоцитів та гнійних тілець. Спостерігається загибель епітеліальних клітин тілець Гассалья в основному за типом пікнозу.

Епітеліальні клітини об'єднані в симпласти з базофільними ядрами та являють собою конгломерати. Кровоносні судини мозкової зони гіперемійовані, також виявляються крововиливи.

У сполучній тканині тимуса периваскулярно виявляються поліморфноклітинні інфільтрати, представлені гістіоцитами, плазмобластами та лімфоїдними клітинами. У кровоносних судинах, поряд з еритроцитами, міститься значна кількість моноцитів.

За гістологічного дослідження препаратів з бурси Фабриціуса з'ясували, що епітелій бурси у курчат дослідної групи високий, рівний, гладкий з чітко вираженим малюнком. Безпосередньо під епітелієм бурси Фабриціуса, між фолікулами виявляються поліморфноклітинні інфільтрати з наявністю невеликої кількості еозинофілів.

У фолікулах добре видно межу між кірковим та мозковим шарами, яка підкреслюється розширеними гіперемійованими кровоносними капілярами. Коркова зона дуже щільна, мозкова більш рихла. У фолікулах виражені просвітлені центри з лімфоцитів і ретикулярної тканини. У сполучній тканині - плазматичні клітини різного ступеня зрілості.

У бурсі Фабриціуса курчат контрольної групи виявлені такі зміни: епітелій бурси більш щільний і знаходиться у стані гіперплазії, вогнищевим катаральним запаленням з утворенням слизу, підепітеліальна зона розширена.

Як в епітелії, так і під ним видно як мікро кістозні ураження, так і більші за розміром. Появу кістозних уражень можна вважати одним з перших ознак інволюції. У деяких ділянках епітелію виявляються вогнища некрозу і гнійного розкладу. Судини при цьому різко гіперемійовані із значною кількістю лейкоцитів.

Фолікули бурси Фабриціуса курчат контрольної групи більш щільні. Центральна зона більшості фолікулів слабо виражена. Між фолікулами значний прошарок молодої сполучної тканини, інфільтрованої лейкоцитами, еозинофілами, макрофагами, лімфобластами та плазматичними клітинами. Значні інфільтрати спостерігаються під епітеліальним шаром.

З периферичних органів імунної системи ми досліджували селезінку. Порівняльний аналіз дослідної та контрольної груп показав, що в обох випадках структурні елементи селезінки були добре виражені.

Були різко окреслені лімфоїдні фолікули. Відмінність полягала в тому, що у курчат дослідної групи селезінка добре виражена, не потовщена. Паренхіма помірно кровонаповнена. У стінці кровоносних судин пульпарного і трабекулярного типів видно помірні процеси проліферації ендотелію. Світлі центри чітко виділялися на загальному фоні селезінки, так як відмежовувалися кровонаповненою червоною пульпою. Чітко виражені лімфатичні фолікули з центральними артеріями та елементи білої пульпи. У фолікулах відзначається активне розмноження лімфобластів.

За гістологічного дослідження зрізів селезінки курчат контрольної групи виявили потовщення капсули, під якою знаходилися клітинні інфільтрати, в основному представлені лейкоцитами, лімфоцитами та псевдоеозинофілами.

Лімфоїдні фолікули курчат контрольної групи були завжди великих розмірів, з активним процесом розпаду лімфоїдних клітин за типом рексіса та пікноза.

Такий же процес відбувався у світлих центрах і червоній пульпі. Червона пульпа селезінки посилено депонувала кров і в ній спостерігався посилений розпад еритроцитів з утворенням гемосидерину. У пульпі переважали клітини гістіоцитарного та фібробластичного ряду, як показник гіперпластичних процесів; різко виражена макрофагальна реакція. Кровоносні судини гіперемійовані. Стінка кровоносних судин у стані активної проліферації, набряку та підвищеної проникності. Периваскулярно також знаходили лейкоцити і лімфоцити.

ВИСНОВКИ

1. Використання бульйонної культури пробіотичного мікробіонта *Aerococcus viridans* штам *BI-07* не викликає патологічних змін у центральних і периферичних органах імунної системи, оптимізує процес формування елементів імунокомпетентних клітин та гальмує ранню інволюцію органів імунної системи, що призводить до більш активного формування клітинної та гуморальної ланки імунітету.

2. Застосування пробіотичної культури *Aerococcus viridans* штам *BI-07* замість набору антибіотиків на початковому етапі відгодівлі курчат-бройлерів ефективно захищає їх від дисбіозу інфекційної етіології з діарейним і респіраторним синдромом, що дозволяє отримувати біобезпечну м'ясну продукцію високої якості без залишкових кількостей антибіотиків.

Перспективи подальших досліджень. Пробіотична культура *Aerococcus viridans* штам *BI-07* ізольована нами від здорових курчат-бройлерів з хорошими фізіолого-біохімічними характеристиками і високою імунобіологічною реактивністю є перспективною мікробіальною моделлю для розробки багатокomпонентного комплексного мультипотентного пробіотичного біопрепарату для нативної фізіологічної стимуляції життєдіяльності молодняка на первинному етапі післяпологового розвитку. Оригінальна культура аерококів штам *BI-07* має виражені імуностимулюючі властивості, з антагоністичною активністю та колонізуючою потенцією, тому є оптимальною основою для конструювання універсального пробіотичного препарату з перших днів життя курчат-бройлерів і молодняка сільськогосподарських тварин.

INFLUENCE PROBIOTIC CULTURES *AEROCOCCUS VIRIDANS* STRAIN *BI-07* ON MORPHOLOGY OF THE IMMUNE SYSTEM BROILER CHICKENS

I. A. Biben

Dnepropetrovsk State Agrarian-Economic University
25, Voroshilova street, Dnipropetrovsk, 49100, Ukraine

S U M M A R Y

One of the main reasons for the decline of young vitality, increasing the incidence of infectious and noninfectious etiologies, and mortality is a low level of functional efficiency immune-biological reactivity due to intensive exploitation of technology physiological resources against a background of depleting the body's stress environment. To increase the vitality of young poultry with medical-prophylactic use of biologically active substances. The most environmentally correct and physiologically effective are probiotics. Replacing antibiotics with probiotics most important task of the veterinary and human medicine, it is necessary to improve the environmental biosafety of poultry products and consumer quality. We have isolated probiotic culture *Aerococcus viridans* strain *BI-07* from healthy broiler chickens in intensive fattening, studied its morphological and tinctorial, cultural, biochemical and biological properties. Showing her a pronounced positive effect on the immune immune-morphogenesis of microorganism.

Keywords: IMMUNOLOGICAL REACTIVITY, PROBIOTICS, BIO-SECURITY, *AEROCOCCUS VIRIDANS*, BROILER CHICKENS, MORPHOLOGICAL AND TINCTORIAL, CULTURAL, BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *AEROCOCCUS VIRIDANS* ШТАММ *VI-07* НА МОРФОЛОГИЮ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

И. А. Бибен

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет
ул. Ворошилова, 25, г. Днепропетровск, 49100, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Одной из основных причин снижения жизнеспособности молодняка, увеличения заболеваемости, инфекционной и неинфекционной этиологии, и смертности является низкий уровень функциональной эффективности иммунобиологической реактивности, обусловленный интенсивными технологиями эксплуатации физиологических ресурсов организма на фоне истощающих стрессов среды обитания. Для увеличения жизнеспособности молодняка сельскохозяйственной птицы с лечебно-профилактической целью применяют биологически активные вещества. Наиболее экологически корректными и физиологически эффективными являются пробиотики. Замена антибиотиков пробиотиками важнейшая задача ветеринарной и гуманной медицины, что необходимо для повышения экологической биобезопасности продукции птицеводства и потребительского качества. Нами была изолирована пробиотическая культура *Aerococcus viridans* штамм *VI-07* от здоровых цыплят-бройлеров при интенсивном откорме, изучены ее морфо-тинкториальные, культуральные, биохимические и биологические свойства. Показано ее ярко выраженное положительное влияние на иммуноморфогенез иммунокомпетентных органов макроорганизма.

Ключевые слова: ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКТИВНОСТЬ, ПРОБИОТИКИ, БИОБЕЗОПАСНОСТЬ, *AEROCOCCUS VIRIDANS*, ЦЫПЛЯТА-БРОЙЛЕРЫ, МОРФО-ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Башкиров О. Г. Выращивание птиц без антибиотиков [Текст] / О. Г. Башкиров // Биологический журнал для специалистов птицеводческих и животноводческих хозяйств. — 2003. — № 4 (31). — С. 35–36.
2. Панин А. Н. Пробиотики в системе рационального кормления животных / А. Н. Панин, Н. И. Малик [Текст] // «Пробиотики, пребиотики, симбиотики и функциональные продукты питания». Науч.-практ. журн. — СПб. — 2007. — С. 59.
3. Тараканов Б. В. Механизм действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных / Б. В. Тараканов [Текст] // Ветеринария. — 2000. — № 1. — С. 47–54.
4. Шендеров Б. А. Медицинская экология и функциональное питание / Б. А. Шендеров [Текст] // Пробиотики и функциональное питание. Т. 3. — М.: Грантъ, 2001. — 288 с.
5. Bergmark S. Colonic food: pre- and probiotics [Text] / S. Bergman // J. Gastroenterol. — 2000. — № 95 (1). — P. 5-7.
6. Bruerton K. Antibiotic growth promoters – are there alternatives [Text] / K. Bruerton // Proc. 2002 Poultry Information Exchange. — 2002. — P. 171–176.
7. Gustafson R. H. Antibiotic use in animal agriculture [Text] / R. H. Gustafson, R. E. Bowen // J. App. Micro. — 1997. — Vol. 83. — P. 531–541.

8. Павлова Н. В. Значение нормальной микрофлоры пищеварительного тракта птиц для их организма [Текст] / Н. В. Павлова, Ф. С. Киржаев, Р. Лапинскайте // Биологический журнал для специалистов птицеводческих и животноводческих хозяйств. — 2002. — № 2 — С. 8–14.
9. Ferket P. R. Use of oligosaccharides and gut modifiers as replacements for dietary antibiotics [Text] / P. R. Ferket // Eagan MN — 2002. — № 17-18. — P. 169-182.
10. Ouwehend A. C. Probiotics: an overview of beneficial effects / A. Ouwehend, S. Salminen, E. Isolauri [Text] // J. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, № 2. — P. 63-72.
11. Соколова К. Я. Научное обоснование необходимости использования пробиотиков в птицеводческих хозяйствах / К. Я. Соколова, И. В. Соловьева, Г. И. Григорьева [Текст] // БИО. — 2005. — № 11. — С. 6-7.
12. Ichikawa H. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat / H. Ichikawa, T. Kuroiwa, A. Inagaki et al. [Text] // Digestiv Dis. Scienc., 1999. — Vol. 44, № 10. — P. 2119–2123.
13. Сорокулова И. Б. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии / И. Б. Сорокулова, В. А. Белявская, В. И. Масычева и др. [Текст] // Вестн. РАМН. — М.: Медицина. — 1997. — № 3. — С. 46-49.
14. Маннапова, Р. Т. Иммунный статус, естественный микробиоз птиц и методы их оценки [Текст] / Р. Т. Маннапова, А. Н. Панин, А. Г. Маннапова и др. — М.: Изд-во Башкирского ГАУ и ВГНКИ, 2001. — 339 с.

Рецензент — О. І. Сосницький, д. вет. н., доцент, Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет