

УДК 579.222+577.152.531+619:615.244:579.88

ПОЛУЧЕНИЕ ЖИДКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ПОЛИСАХАРИДЫ *CRYPTOCOCCUS FLAVESCENS* 1-АЛ-3, И ОЦЕНКА ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN VIVO*

С. А. КУЛИШ¹, Л. И. САПУНОВА¹, А. А. ПРУСАКОВА²,
И. О. ТАМКОВИЧ¹, А. Г. ЛОБАНОК¹, Л. В. ЕРХОВА¹,
Ж. В. ВИШНЕВЕЦ², Н. С. МОТУЗКО²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
microbio@mbio.bas-net.by, enzyme@mbio.bas-net.by
²Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь,
lnasturziya@yandex.ru

На основе селектированного и детально охарактеризованного дрожжевого гриба *Cryptococcus flavescens* 1-АЛ-3 наработан лабораторный образец кормовой добавки, содержащей полисахариды штамма-производителя. При введении продукта в рацион лабораторных животных установлено достоверное, не выходящее за пределы нормы, повышение концентрации общего белка, альбуминов и глобулинов в крови лабораторных животных, ее лизоцимной и бактерицидной активности, а также фагоцитарной активности нейтрофилов. Полученные результаты указывают на возможные иммуностимулирующие свойства внеклеточных полисахаридов, синтезируемых исследуемыми дрожжами.

Введение. В современном животноводстве все более широкое распространение получают кормовые добавки функционального назначения, в том числе содержащие в своем составе живые клетки дрожжей. Выявлено их положительное влияние на состав, жизнеспособность и взаимоотношения микрофлоры желудочно-кишечного тракта [1–3]. Включение живых дрожжей в рационы повышает устойчивость животных к патогенам, в частности, к возбудителям кокцидиальных [4], сальмонидных [5, 6] и других инфекций. Это обуславливает их применение для профилактики воспалительных процессов [7] и кишечных инфекций [8, 9], а совместно с антикокцидиальными ионофорами или вакцинами – для контроля некротических энтеритов [10].

Эффект от использования дрожжей проявляется также в активизации метаболизма нормофлоры кишечного тракта животных и птицы и повышении ее ферментативной активности [11–13], регулировании метанообразования [14, 15], нормализации кислотно-щелочного баланса желудочно-кишечного тракта, что устраняет ацидозы [15, 16]. При этом улучшается пищеварение [17], повышается метаболический, биохимический [18, 19], иммунный [2, 4, 20–24] и репродуктивный [25, 26] статус животных, увеличивается их продуктивность [4, 17, 22], повышается качество продуктов питания [27, 28].

Известны также антиоксидантные [29] и детоксикационные (сорбционные) свойства дрожжей и/или их полисахаридов в отношении содержащихся в кормах токсинов [30, 31]. Использование дрожжей в рационах жвачных животных предотвращает побочные эффекты от тепловых стрессов [32], уменьшает неприятный запах пищевых отходов и навоза [8].

Множественный положительный эффект дрожжей обуславливает актуальность работ по созданию кормовых добавок полифункционального действия. Продукты на основе живых (активных) дрожжей, часто дополненные дрожжевыми клеточными стенками или их структурными компонентами (поли- и олигосахаридами), пептидами, пробиотиками, ферментами и другими биологически активными веществами, представлены европейскими, американскими и китайскими производителями [33]. В Институте микробиологии НАН Беларуси на основе аспорогенных капсулированных дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ У-228 Д [34, 35] создана опытно-промышленная технология получения биологически активной кормовой добавки пребиотического действия «КриптоЛайф®», обоснован способ ее применения [36] и освоено производство в жидкой и сухой форме.

Цель исследования – разработка и оценка биологической активности новой кормовой добавки, содержащей живые дрожжи и их внеклеточные полисахариды.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использован штамм дрожжевого гриба *Cryptococcus flavescens* 1, депонированный в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под акронимом БИМ У-228 Д, а также его варианты, адаптированные к высоким концентрациям лактозы и глюкозы.

Многоступенчатую адаптивную селекцию *C. flavecens* 1 по признаку синтеза полисахарида проводили на агаризованных средах с возрастающими концентрациями глюкозы или лактозы (5,0 → 7,0 → 10,0 % по углероду). На первом этапе из каждой десятой генерации дрожжей, полученной путем последовательного пересева культуры на указанные среды (26–28 °С, 48 ч), отбирали быстро растущие колонии с видимой продукцией полисахарида.

На втором этапе изоляты характеризовали по признаку продукции внеклеточных полисахаридов в условиях глубинного культивирования (200 об/мин, 26–28 °С, 72 ч) в питательных средах с различным содержанием глюкозы и лактозы (1,0–10,0 % по углероду). По окончании культивирования биомассу дрожжей отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (8000 g, 15 мин), трижды повторяя процедуру. Полисахарид из охлажденного бесклеточного супернатанта выделяли осаждением этанолом при их соотношении 1 : 2 (об/об.). Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, трижды промывали этиловым спиртом, высушивали при 50 °С до постоянного веса, взвешивали.

Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностей культур дрожжевых грибов проводили общепринятыми в микробиологии методами, ферментативной активности – на сусло-агаре, содержащем субстраты соответствующих ферментов, при температуре 24–26 °С в течение 96 ч. Способность исследуемых культур синтезировать протеазу, α -амилазу, глюкоамилазу, ксиланазу, β -глюканазу, целлюлазу, фитазу, пектацтилазу, α - и β -галактозидазу, липазу оценивали по наличию зон просветления или зон специфического окрашивания продуктов ферментативных реакций вокруг их колоний, образующихся в результате гидролиза соответствующих субстратов [37].

Лабораторный образец кормовой добавки получали путем глубинного культивирования *C. flavecens* 1-АЛ-3 в колбах Эрленмейера при 26–28 °С на качалке (190–210 об/мин) в течение 48 ч в среде, содержащей молочную сыворотку. В качестве посевного материала использовали 4 об.% культуры дрожжей, выращен-

ных при 26–28 °С на качалке (190–210 об/мин) в течение 16 ч в жидкой питательной среде указанного выше состава.

Определение токсигенности *C. flavescens* 1-АЛ-3, а также острой и подострой оральной токсичности лабораторного образца кормовой добавки выполнено в Витебской государственной академии ветеринарной медицины.

Изучение биологической эффективности действия кормовой добавки, полученной с использованием *C. flavescens* 1-АЛ-3, проводили на беспородных белых мышах-самцах массой 25–30 г в возрасте 2–3 мес., содержащихся в стандартных условиях вивария. Для этого мышей разделяли на контрольную (интактные мыши) и опытную (мыши, получавшие жидкую кормовую добавку с первого дня опыта из расчета 0,1 г полисахарида / кг веса) группы, по 15 голов в каждой.

Кормовую добавку, разбавленную водой до соответствующего содержания полисахаридов, выпаивали мышам перорально с помощью зонда.

Для оценки иммуностимулирующего действия кормовой добавки определяли морфологические (лейкоциты) и биохимические (количество общего белка, альбумина, α -, β -, γ -глобулинов) показатели крови мышей, а также показатели естественной резистентности (бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови, фагоцитарная активность нейтрофилов, фагоцитарное число и фагоцитарный индекс) при постановке опыта, на 7-е и 14-е сут его выполнения.

Взятие крови у животных проводили утром натощак до введения в их рацион кормовой добавки, а также на 7-е и 14-е сут опыта. Кровь стабилизировали гепарином, сыворотку получали отделением коагулята центрифугированием (2000–3000 г, 10–15 мин при комнатной температуре).

Все биохимические показатели сыворотки крови определяли общепринятыми методами с использованием диагностических наборов производства фирмы «PZ CORMAY S. A.» (Польша) на автоматическом биохимическом анализаторе «BS-300» («Mindray Medical International Limited», Китай).

Количество лейкоцитов в крови подсчитывали в камере Горяева. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли со-

гласно [38], бактерицидную – фотонейлометрическим методом [39], лизоцимную – по [40].

Уход за мышами и эксперименты *in vivo* проводили в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными [41].

Приведенные результаты представляют собой усредненные данные 3–5 опытов, выполненных в трех повторностях. При статистической обработке результатов использовали компьютерную программу ВІОМ 2716. Статистически значимыми признавали различия с уровнем вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Ранее нами был получен штамм *C. flavescens* 1 (БИМ У-228 Д) – продуцент комплекса биологически активных веществ [29, 30]. Для повышения продукции полисахаридов проводили многоступенчатую адаптивную селекцию *C. flavescens* 1 на агаризованных средах с последовательно возрастающим содержанием глюкозы (АГ) или лактозы (АЛ) в ряду 5,0 → 7,0 → 10,0% по углероду.

В результате из каждой десятой генерации, полученной последовательной перевивкой на указанные среды, отобрано 6 быстро растущих колоний дрожжей с видимой продукцией полисахарида, по три с каждой селективной среды. Количественная оценка образования полисахаридов показала, что максимальным их выходом характеризуются 2 культуры, выявленные на агаризованных средах с лактозой и глюкозой (10,0% по углероду) и обозначенные соответственно как *C. flavescens* 1-АЛ-3 и *C. flavescens* 1-АГ-1.

Установлено, что отобранные культуры в 1,4–1,5 раза превосходят исходный штамм *C. flavescens* 1 по уровню синтеза внеклеточных полисахаридов (рис. 1), однако максимум их образования при выращивании в жидких средах как с глюкозой, так и с лактозой (3%) отмечен у изолята 1-АЛ-3.

Для создания кормовой добавки выбран штамм *C. flavescens* 1-АЛ-3, характеризующийся следующими культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими особенностями. На 2-е сут роста на пептонно-дрожжевом агаре с лактозой он образует гладкие, круглой формы, выпуклые, блестящие, светло-бежевого цвета колонии размером 5–7 мм.

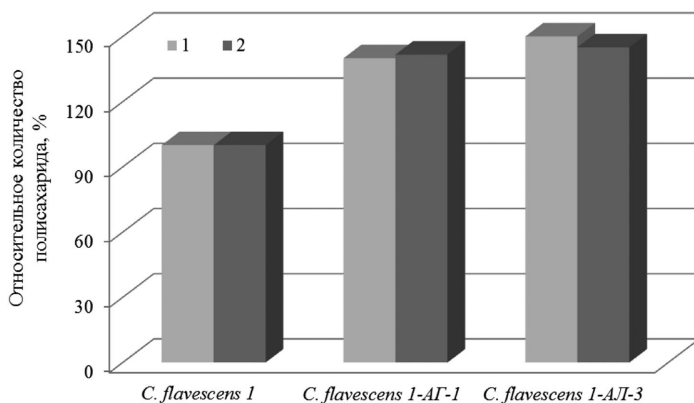


Рис. 1. Продукция полисахаридов исходным штаммом *C. flavescens 1* и селективными штаммами в неоптимизированных условиях культивирования: 1 – среда с глюкозой; 2 – среда с лактозой

Штамм *C. flavescens 1-АЛ-3* – аэроб, хемоорганотроф. Ассимилирует лактозу, глюкозу, галактозу, сахарозу, маннит, фруктозу, глицерин, крахмал, пектин и целлобиозу. Утилизирует триптон, пептон, мочевины, аминокислоты, аммонийные и нитратные формы неорганического азота. Желатину не разжижает, молоко не пептонизирует. Производит β -галактозидазу, протеазу, липазу. Оптимальные условия для роста штамма – температура 27 °С и активная кислотность среды, соответствующая рН 6,5.

Согласно результатам исследований, проведенных в Витебской государственной академии ветеринарной медицины на лабораторных животных, *C. flavescens 1-АЛ-3* не обладает токсическими свойствами, не проявляет местнораздражающего (резорбтивного) действия.

С целью определения биологической активности разработан лабораторный образец жидкой кормовой добавки, содержащей внеклеточные полисахариды *C. flavescens 1-АЛ-3*. Препарат при одно- и многократном пероральном введении в дозе 25 000 мг/кг веса лабораторных животных токсическим действием не обладает, что позволяет отнести его к IV классу опасности – веществам малоопасным.

Для оценки биологического действия кормовой добавки *in vivo* определяли показатели крови, свидетельствующие об иммун-

ном статусе мышей, – морфологические (лейкоциты) и биохимические (количество общего белка, альбумина, α -, β -, γ -глобулинов). О влиянии препарата на естественную резистентность лабораторных животных судили по показателям бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности нейтрофилов, фагоцитарному числу и фагоцитарному индексу.

Как видно из представленных на рис. 2 данных, на 7-е сут после введения в рацион кормовой добавки на основе *C. flavescens* 1-АЛ-3 уровень лейкоцитов в крови мышей повышается на 34,7% ($p < 0,01$), через 14 дней – на 46,1% ($p < 0,05$), однако находится в пределах нормы.

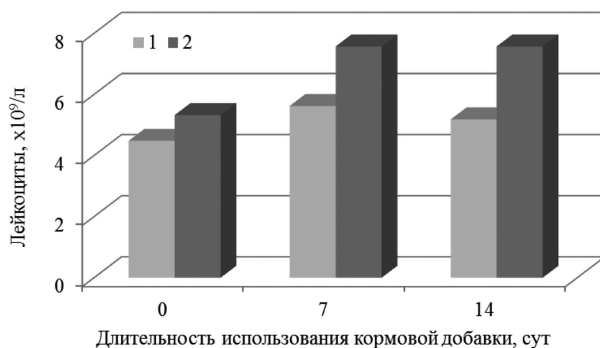


Рис. 2. Влияние кормовой добавки на содержание лейкоцитов в крови мышей: 1 – без добавки; 2 – с добавкой

Кормовая добавка оказывает также значительное влияние на содержание в крови мышей общего белка, участвующего в иммунной защите организма (рис. 3). Так, в течение исследуемого периода времени в крови контрольной группы животных отмечаются лишь незначительные колебания его количества. В то же время величина этого показателя крови у мышей, принимавших кормовую добавку, достоверно увеличивается, превышая контрольную величину на 21,5% ($p < 0,001$) и 14,7% ($p < 0,05$) на 7-е и 14-е сут соответственно.

У мышей опытной группы отмечается также не выходящее за пределы нормы повышение на 19,5% ($p < 0,01$) концентрации

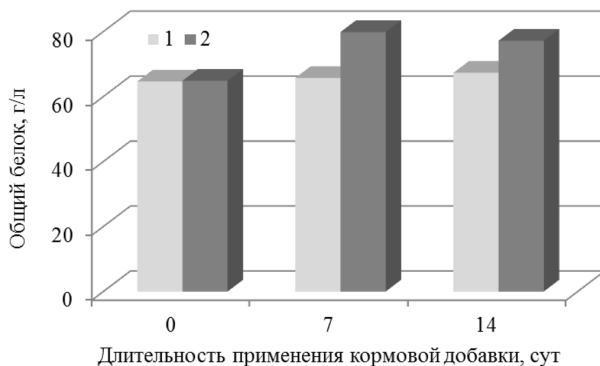


Рис. 3. Влияние кормовой добавки на концентрацию общего белка в крови мышей: 1 – без добавки; 2 – с добавкой

альбумина (рис. 4), что указывает на активно протекающий протеосинтез, обусловленный применением кормовой добавки.

В крови животных опытной группы выявляется также повышенное содержание глобулинов (рис. 5). Как видно, применение кормовой добавки с высокой степенью достоверности увеличивает концентрацию α -глобулинов (на 8,5–10,7%, $p < 0,05$), β -глобулинов (на 22,0–22,5%, $p < 0,01$), γ -глобулинов (на 17,5–19,9%, $p < 0,05$). Повышение в крови содержания γ -глобулинов обусловлено, по-видимому, иммуностимулирующим действием присутствующих в составе кормовой добавки полисахаридов. Послед-

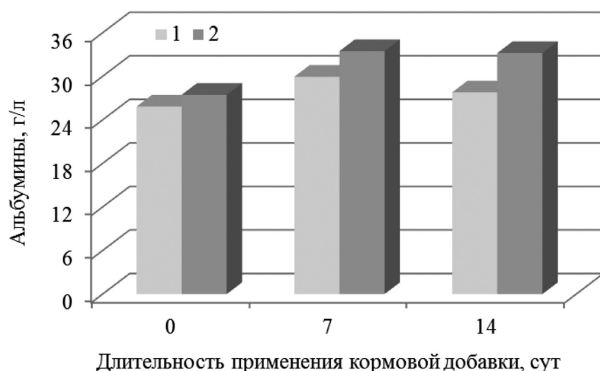


Рис. 4. Влияние кормовой добавки на количество альбуминов в крови мышей: 1 – без добавки; 2 – с добавкой

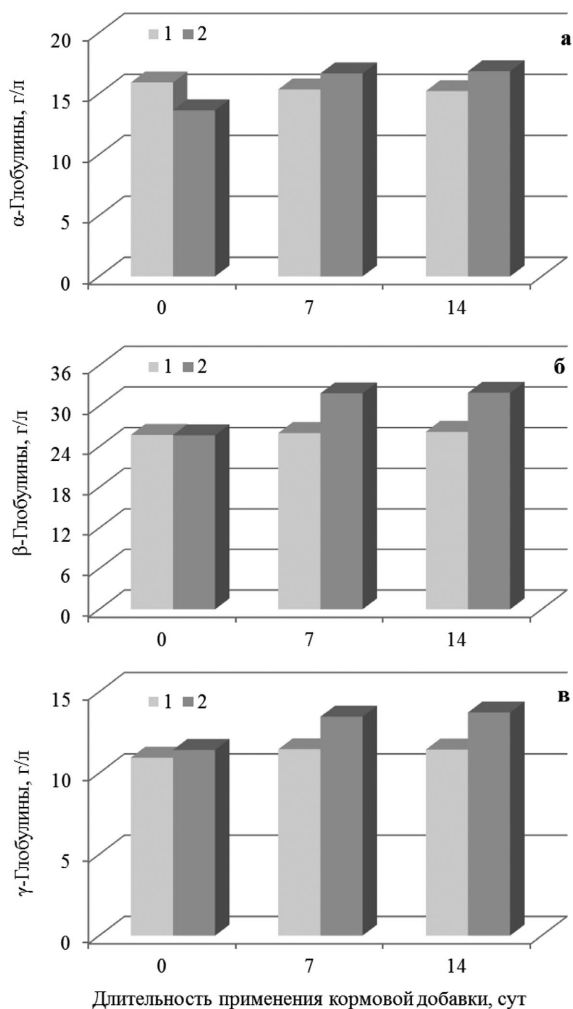


Рис. 5. Влияние кормовой добавки на концентрацию альбуминов в крови мышей: 1 – без добавки; 2 – с добавкой

ние, согласно данным литературы, активируют клетки, участвующие в реакциях как клеточного, так и гуморального иммунного ответа [42].

Среди гуморальных факторов, обуславливающих бактериостатическое и бактерицидное свойство крови и ее сыворотки,

важное место принадлежит лизоциму. Этот фермент, помимо прямого антибактериального действия, активирует систему мононуклеарных фагоцитов, стимулирует фагоцитоз, образование антител и пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. Полученные нами результаты (рис. 6) свидетельствуют о повышении лизоцимной активности (ЛАСК) сыворотки крови опытной группы мышей по сравнению с контрольным показателем на 18,8% ($p < 0,001$) на 7-е сут и на 22,3% ($p < 0,001$) – на 14-е сут применения кормовой добавки.

Показателем суммарной активности гуморальных факторов резистентности организма служит бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК), величина которой у потребляющих исследуемую кормовую добавку мышей превышает контрольный показатель на 22,9% ($p < 0,001$) уже на 7-е сут и далее поддерживается на достигнутом уровне.

В отличие от гуморальных клеточные защитные механизмы реализуются посредством фагоцитарной активности микро- и макрофагов. Фагоцитарную способность лейкоцитов оценивали по фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов, фагоцитарному числу (ФЧ) и фагоцитарному индексу (ФИ). Согласно полученным экспериментальным данным, у мышей опытной группы фиксируется достоверно более высокий (на 16,7–12,2%, $p < 0,05$), чем у животных контрольной группы, уровень фагоцитарной активности нейтрофилов (рис. 6).

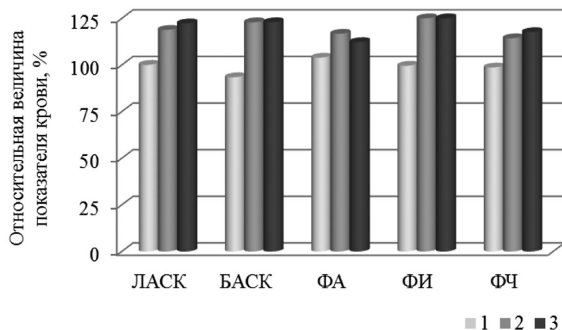


Рис. 6. Динамика изменения показателей крови при введении в рацион мышей кормовой добавки. Длительность использования кормовой добавки: 1 – 0 сут; 2 – 7 сут; 3 – 14 сут

Максимум поглотительной способности (ФИ) нейтрофилов у мышей, в рацион которых введена кормовая добавка, обнаруживается на 7-е сут, незначительно повышается к концу опыта (14-е сут) и превосходит контрольную величину на 26,6–27,9% ($p < 0,01$).

Фагоцитарное число нейтрофилов крови у мышей опытной группы уже через 7-е и 14-е сут применения кормовой добавки возрастает соответственно на 14,3 и 17,6% ($p < 0,05$) по сравнению с его величиной у животных контрольной группы.

Заключение. В результате выполненных исследований селектирован и охарактеризован новый штамм *C. flavescens* 1-АЛ-3 с повышенным в 1,4–1,5 раза по сравнению с исходной культурой уровнем продукции внеклеточных полисахаридов. Методом его глубинного культивирования в среде с молочной сывороткой наработан лабораторный образец кормовой добавки для оценки иммунного действия. Установлено, что содержащая полисахариды кормовая добавка в ежедневной дозе, эквивалентной 0,1 г полисахарида / 1 кг веса, достоверно увеличивает содержание общего белка, альбуминов, глобулинов в крови лабораторных животных, а также стимулирует ее лизоцимную и бактерицидную активность, повышает фагоцитарную активность нейтрофилов, фагоцитарный индекс и фагоцитарное число. Полученные результаты указывают на то, что кормовая добавка, содержащая полисахариды дрожжевого гриба *C. flavescens* 1-АЛ-3, активизирует неспецифический гуморальный и клеточный иммунитет лабораторных животных. Дальнейшие исследования будут направлены на выделение, очистку, изучение строения и оценку биологического действия полисахаридов *C. flavescens* 1-АЛ-3 – основы новой кормовой добавки комплексного действия.

Литература

1. Oeztuerk, H. Role of live yeasts in rumen ecosystem / H. Oeztuerk, V. Sagmanligil // Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. – 2009. – Vol. 116, № 7. – P. 244–248.
2. Repeated acidosis challenges and live yeast supplementation shape rumen microbiota and fermentations and modulate inflammatory status in sheep / M. Silberberg [et al.] // Animal. – 2013. – Vol. 7, № 12. – P. 1910–1920.
3. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different con-

centrate-to-forage ratios / G. Ding [et al.] // J. Anim. Sci. Biotechnol. – 2014. – Vol. 5, № 1. – P. 1–9.

4. *Shanmugasundaram, R.* Effect of yeast cell product (CitriStim) supplementation on broiler performance and intestinal immune cell parameters during an experimental coccidial infection / R. Shanmugasundaram, M. Sifri, R. K. Selvaraj // Poultry Sci. – 2013. – Vol. 92, № 2. – P. 358–363.

5. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids / D. L. Merrifield [et al.] // Aquaculture. – 2010. – Vol. 302, № 1–2. – P. 1–18.

6. Effects of dietary yeast cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in *Atlantic salmon* (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal / S. Refstie [et al.] // Aquaculture. – 2010. – Vol. 305, № 1–4. – P. 109–116.

7. Composition for human and/or animal nutrition, uses thereof and yeasts: application WO 2009/103884: IPC C12N1/18, A23L1/30, A61K36/064, A61P1/00, C12R1/865 / Lesaffre & Cie [FR], Univ D Auvergne Clermont 1 [FR], Univ Lille Ii Droit & Sante [FR]; publ. date: 27.08.2009.

8. Composition of mixed microorganisms growing in super-highly acidic conditions, and use thereof: application WO 2011/05927 A2: IPC A23K1/16; A23K1/18; C12N1/20 / LEE JONG SOO [KR]; publ. date: 12.05.2011.

9. Clay interlaced yeast compositions and methods of utilizing the same: application US 2011033576 A1: IPC A23L1/28, A23K1/18, C12N1/16 / Alltech Inc [US]; publ. date: 10.02.2011.

10. Compositions and methods for controlling diseases in animals: application US 2012244191 A1: IPC A61K36/064, A61K39/012, A61P1/00, A61P29/00, A61P31/04, A61P33/02, A61P37/04 / Skinner James [US], Rupp Doug [US], Alpharma LLC [US]; publ. date: 27.09.2012.

11. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet / J. P. Jouany [et al.] // J. Anim. Sci. – 2009. – Vol. 87, № 9. – P. 2844–2852.

12. *Tripathi, M. K.* Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb / M. K. Tripathi, S. A. Karim // Livestock Sci. – 2011. – Vol. 135, № 1. – P. 17–25.

13. Effect of transportation on fecal bacterial communities and fermentative activities in horses: impact of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 supplementation / C. Faubladiere [et al.] // J. Anim. Sci. – 2013. – Vol. 91, № 4. – P. 1736–1744.

14. *Saccharomyces cerevisiae* live cells decreased *in vitro* methane production in intestinal content of pigs / Y. L. Gong [et al.] // Asian-Austral. J. Anim. Sci. – 2013. – Vol. 26, № 6. – P. 856–863.

15. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows / Y.-H. Chung [et al.] // J. Dairy Sci. – 2011. – Vol. 94, № 5. – P. 2431–2439.

16. Behavioural adaptations of sheep to repeated acidosis challenges and effect of yeast supplementation / L. Commun [et al.] // Animal. – 2012. – Vol. 6, № 12. – P. 2011–2022.

17. Pérez-Ruchel, A. Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture / A. Pérez-Ruchel, J. L. Repetto, C. Cajarville // J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). – 2013. – Vol. 97, № 6. – P. 1043–1050.

18. The effect of body condition score at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, metabolic status, and rumen fermentation of dairy cows in early lactation / R. M. Al Ibrahim [et al.] // J. Dairy Sci. – 2010. – Vol. 93, № 11. – P. 5318–5328.

19. *Ex vivo* effect of yeast beta-glucan on lymphocyte viability and plasma IL-18 in weaning piglets / A. Ganner [et al.] // Livestock Sci. – 2010. – Vol. 133, № 1–3. – P. 246–248.

20. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens / I. R. Rajput [et al.] // Poult. Sci. – 2013. – Vol. 92, № 4. – P. 956–965.

21. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* / Y. Ma [et al.] // Fish Shellfish Immunol. – 2013. – Vol. 34, № 1. – P. 66–73.

22. The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets / M. Trckova [et al.] // J. Anim. Sci. – 2014. – Vol. 92, № 2. – P. 767–774.

23. Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses / T. K. Ghosh [et al.] // J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). – 2012. – Vol. 96, № 2. – P. 275–284.

24. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens / I. R. Rajput [et al.] // Poult. Sci. – 2013. – Vol. 92, № 4. – P. 956–965.

25. Effect of timing of post-partum introduction to pasture and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, metabolic status, energy balance and some reproductive parameters in early lactation dairy cows / R. M. Al Ibrahim [et al.] // J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl). – 2013. – Vol. 97, № 1. – P. 105–114.

26. The effect of body condition at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on energy status and some reproductive parameters in early lactation dairy cows / R. M. Al Ibrahim [et al.] // Anim. Reprod. Sci. – 2010. – Vol. 121, № 1–2. – P. 63–71.

27. Effect of dietary supplementation with different sources of selenium on growth response, selenium blood levels and meat quality of intensively finished Charolais young bulls / G. Cozzi [et al.] // Animal. – 2011. – Vol. 5, № 10. – P. 1531–1538.

28. Composite microbial fodder additive: application CN 1640293 A: IPC A23K1/16, A23K1/165 / SUFU BIOLOG TECHNOLOGY DEV CO [CN]; publ. date: 20.07.2005.

29. Effects of dietary yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the antioxidant system in the liver of juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* / M. P. Santacroce [et al.] // Fish Physiol. Biochem. – 2012. – Vol. 38, № 5. – P. 1497–1505.
30. Biotoxin sorbent and method for preparing the same: application US 2010189871 A1: IPC A23K1/175; B01J20/12; B01J20/22; C12P19/04 / Yu Xuefeng [CN]; Li Zhihong [CN]; Yu Minghua [CN]; Yao Juan [CN]; Tan Bin [CN]; Zhu Jinlin [CN]; publ. date: 29.07.2010.
31. Blank, R. Effects of live yeast cell supplementation to high concentrate diets on the toxicokinetics of ochratoxin A in sheep / R. Blank, S. Wolfram // Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. – 2009. – Vol. 26, № 1. – P. 119–126.
32. Yeast-containing composition used as cow feed additive: application CN 101536732 A: IPC A23K1/00 / ANGEL YEAST CO LTD; publ. date: 23.09.2009.
33. Дрожжи как основа биологически активных кормовых добавок про- и пребиотического действия / А. Г. Лобанок [и др.] // Вест. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2014. – № 1. – С. 17–22.
34. Штамм дрожжей *Cryptococcus flavescens* БИМ Y-228-Д – продуцент комплекса биологически активных веществ: пат. ВУ 19638 / Л. И. Сапунова, А. А. Костеневич, А. Г. Лобанок; дата публ.: 28.02.2014.
35. Способ получения комплекса биологически активных веществ, включающего бета-галактозидазу, галактоолигосахариды и полисахариды: пат. ВУ 20422 / Л. И. Сапунова, А. А. Костеневич, А. Г. Лобанок; дата публ.: 30.04.2014.
36. Способ кормления цыплят-бройлеров и телят: пат. ВУ 19960 / Л. И. Сапунова, А. А. Костеневич, А. Г. Лобанок, Н. А. Шарейко, Н. П. Разумовский, А. В. Жалнеровская, А. М. Синцерова, А. В. Сандул, Е. А. Долженкова; дата публ.: 30.06.2014.
37. Buzzini, P. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like isolated from tropical environments / P. Buzzini, A. Martini // J. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 93, № 6. – P. 1020–1025.
38. Методические указания по определению естественной резистентности и путей ее повышения у молодняка сельскохозяйственных животных / С. С. Абрамов, А. Ф. Могиленко, А. И. Ятусевич. – Витебск, 1989. – 40 с.
39. Смирнова, О. В. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейфелометрии / О. В. Смирнова, Т. А. Кузьмина // Журн. микробиол. – 1966. – № 4. – С. 8–11.
40. Дорофейчук, В. Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом / В. Г. Дорофейчук // Лабораторное дело. – 1968. – № 1. – С. 28–30.
41. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Приказ Министерства здравоохранения СССР 12.03.1977, № 755.
42. Влияние сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Laminaria japonica* на морфологию лимфоидных органов и функциональную характеристику иммунокомпетентных клеток / Е. А. Лебединская [и др.] // Биомед. хим. – 2014. – Т. 60, вып. 5. – С. 581–590.

**PRODUCTION OF LIQUID FEED ADDITIVE CONTAINING
CRYPTOCOCCUS FLAVESCENS 1-AL-3 POLYSACCHARIDES
AND EVALUATION OF ITS BIOLOGICAL ACTIVITY *IN VIVO***

S. A. KULISH¹, L. I. SAPUNOVA¹, A. A. PRUSAKOVA², I. A. TAMKOVICH¹,
A. G. LOBANOK¹, L. V. YARKHOVA¹, ZH. V. VISHNEVETS, N. S. MOTUZKO

¹*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
enzyme@mbio.bas-net.by; microbio@mbio.bas-net.by*

²*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus,
sharejko@mail.ru*

Based on thoroughly characterized yeast-like fungus *Cryptococcus flavescens* 1-AL-3, laboratory specimen of feed additive containing polysaccharides of microbial strain was produced. Supply of the product into the rations of lab animals has revealed significant but not surpassing limits increase in concentrations of total protein, albumins and globulins in blood, its lysozyme and bactericidal activity, as well as phagocytic activity of neutrophils. The obtained results indicate possible immune stimulation properties of extracellular polysaccharides synthesized by the tested yeast culture.

Поступила в редакцию 04.05.2018 г.

УДК 579.62; 663.087.8:638.1:602(476)

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРАКТИЧЕСКОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОБИОТИКОВ В ПЧЕЛОВОДСТВЕ**

И. М. ЛОЙКО¹, А. Г. ЩЕПЕТКОВА¹, Т. М. СКУДНАЯ¹,
Н. В. ХАЛЬКО¹, Е. В. БОЛОТНИК², И. И. ГАПОНОВА²,
О. В. МАКАРЕВИЧ², О. В. МОЛЧАН²

¹*Гродненский государственный аграрный университет,
Гродно, Беларусь,
ggau@ggau.by*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
bolotnik_allena@mbio.bas-net.by*

На основании токсикологических испытаний установлено, что скармливание медоносным пчелам пробиотических препаратов на основе молочнокислых, бифидо- и спорообразующих бактерий в условиях садковых опытов не оказывает отрицательного воздействия на физиологическое состояние пчел. Отмечено, что наиболее благоприятные показатели сохранности и жиз-